Aus der Universitäts-Kinderklinik in Marburg
Direktor: Prof. Dr. F. Linneweh

Der Guthrie-Test, eine Methode zur Phenylalanin-Bestimmung im Blut

Seine Verwendung zur Früherfassung der Phenylketonurie und zu ihrer diätetischen Einstellung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Wolf-Dieter von Eicken
aus Marburg

Marburg 1966

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus der Universitäts-Kinderklinik in Marburg
Direktor: Prof. Dr. F. Linneweh

Der Guthrie-Test, eine Methode zur Phenylalanin-Bestimmung im Blut

Seine Verwendung zur Früherfassung der Phenylketonurie und zu ihrer diätetischen Einstellung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Wolf-Dieter von Eicken

aus Marburg

Marburg 1966

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der
Universität Marburg am 14. Juli 1966

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. med. O. Braun-Falco

Referent: Prof. Dr. med. H. Bickel

Correferent: Prof. Dr. med. R. Siegert

I N H A L T

	Seite
E i n l e i t u n g	1
Erster Teil	1
A Definition der Phenylketonurie	1
B Die wichtigsten Phenylalanin-Bestimmungsmethoden im Blut	2
1. Kolorimetrische Methode nach KAPELLER und ADLER	2
2. Mikrobiologische Methode nach HENDERSON und SNELL	2
3. Säulenchromatographische Methode nach MOORE und STEIN	3
4. Enzymatische Methode nach UDENFRIEND und COOPER	3
5. Papierchromatographische Methode nach BERRY	3
6. Enzymatisch spektrophotometrische Methode nach LA DU und MICHAEL	4
7. Fluorimetrische Methode nach Mc CAMAN und ROBINS	5
8. Mikrobiologischer Hemmtest nach GUTHRIE und SUSI	5
Zweiter Teil	5
A Methodik des GUTHRIE-Testes	5
1. Prinzip	5
2. Praktische Ausführung	6
a) Gewinnung der Blutproben	6
b) Herstellung des Mediums	8
c) Sporenpräparation	10
d) Der Hemmstoff ß-2-Thienylalanin	11
e) Herstellung der Phenylalanin-Standardwerte (Kontrollen)	11
f) Herstellung eines Testes	12
3. Weitere methodische Untersuchungen	13
a) Agar-Agar	13
b) Filterpapier	13
c) Größe der Blutflecken	13
d) Lagerung der Kontrollen	14
e) Medium-Zusammensetzung	15
f) Autoklav oder Heißluftsterilisator	16

Seite

B Ergebnisse 17

1. Untersuchung des Testes auf Spezifität 17
2. Untersuchung des Testes auf Sensitivität 18
   a) Untersuchung der Ergebnisse auf Reproduzierbarkeit 18
      α) Vollblutproben 18
      ß) Serumproben 21
   b) Streuung der Phenylalanin-Kontrollen 23
      α) Vollblutkontrollen 23
      ß) Serumkontrollen 23
   c) Meßbereich der Kontrollen 24
      α) Serumkontrollen 24
      ß) Vollblutkontrollen 27
   d) Vergleich der Ergebnisse des GUTHRIE-Testes mit LA DU-Bestimmungen 29
      α) Vergleich von Ergebnissen des GUTHRIE-Vollbluttestes mit denen der LA DU-Methode 29
      ß) Vergleich von Ergebnissen des GUTHRIE-Serumtestes mit denen der LA DU-Methode 31
   e) Einwirkungen von Antibiotika und Sulfonamiden 33
   f) Folgerungen aus den Sensitivitäts-Untersuchungen 34
3. Physiologische und pathologische Befunde bei Neugeborenen-Massentestungen zur Auffindung von Phenylketonurikern 34
   a) Reifgeborene 36
      α) Physiologische Befunde 36
      ß) Pathologische Befunde 37
   b) Frühgeborene 38
   c) Summarische Betrachtung der Früh- und Reifgeborenen 39
4. Ergebnisse bei Massentestungen unter Schwachsinnigen 40
5. Ergebnisse des Testes bei der diätetischen Einstellung von Phenylketonurikern 44
   a) Photographische Dokumentation von vier Verläufen phenylketonurischer Patienten während der diätetischen Einstellung 44
   b) Gegenüberstellung der Phenylalanin-Blutspiegel nach dem GUTHRIE-Test, der Aminosäurenausscheidung nach 2-dimensionaler Papierchromatographie und der $FeCl_3$-Proben 48

	Seite
Dritter Teil	53
A Diskussion	53
B Hinweis auf drei weitere Stoffwechselkrankheits-Teste	59
1. Ahorn-Sirup-Test	60
2. Histidinämie-Test	60
3. Galaktosämie-Test	60
Zusammenfassung	61
Literaturverzeichnis	63

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554417_0100

E I N L E I T U N G

Die Phenylalanin-Bestimmung im Blut bekam praktische klinische Bedeutung, als bekannt wurde, daß bei hohem Phenylalanin-Spiegel Schwachsinn entsteht und als es gelang, durch rechtzeitige diätetische Herabsetzung des Phenylalanin-Blutspiegels den Schwachsinn zu verhindern [1,3,8-11,38].

E R S T E R T E I L

A DEFINITION DER PHENYLKETONURIE

Die mit hohen Phenylalanin-Blutspiegeln einhergehende Schwachsinnsform, die Phenylketonurie, wurde 1934 von FÖLLING [16] entdeckt. Die Erkrankung beruht auf einem rezessiv vererbten Enzymblock der Phenalalaninoxydase [35,47,56,57]. Dadurch wird der normale Abbau des Phenylalanins zu Tyrosin verhindert. Die Folge ist ein Anstieg des Phenylalanin-Blutspiegels von normal 0,8 - 1,5 mg% auf Werte weit über 20 mg%, ja bis zu 60 mg% und höher, sowie eine vermehrte Phenylalanin-Ausscheidung im Urin. Infolge des erhöhten Substratdruckes werden normalerweise wenig benutzte Stoffwechselwege beschritten, was zu einer Vermehrung von Phenylbrenztraubensäure [17,34] und deren Metaboliten Phenylmilchsäure [34,35,61] und Phenylessigsäure im Harn führt; letztere hauptsächlich in Form von Phenylacetylglutamin [58]. Auf die weiteren "Stoffwechselnotausgänge" sei in diesem Zusammenhang nicht eingegangen.

ARMSTRONG und Mitarbeiter konnten feststellen, daß die Serumphenylalanin-Spiegel bei phenylketonurischen Neugeborenen noch völlig normal liegen und erst in den nächsten Lebenstagen nach Fütterung der Säuglinge mit Milch auf erhöhte Werte ansteigen [2,5].

Die sekundären Stoffwechselanomalien treten noch später in Erscheinung. So wird die Phenylbrenztraubensäure erst bei Serumphenylalanin-Konzentrationen über 15 mg% im Urin ausgeschieden, bei temporärem Phenylalanintransaminasemangel Neugeborener erst bei noch höheren Phenylalaninserumwerten [4,5]. Es wird verständlich, warum die mit der Ferrichloridprobe faßbare Phenyl-

brenztraubensäure-Ausscheidung im Urin junger Phenylketonuriker meist erst in der dritten bis sechsten Lebenswoche ein pathologisches Resultat zeigt.

Aus diesen Gründen ist weder für die Frühdiagnose der Erkrankung noch für die Kontrolle ihrer diätetischen Einstellung die Phenylbrenztraubensäure-Bestimmung im Urin eine gute Methode. Vielmehr ist sowohl für die Früherfassung als auch für die Kontrolle der Diät die Bestimmung des Phenylalanins im Blut heute noch die beste Methode in Ermangelung einer von LINNEWEH und EHRLICH geforderten säulenchromatographischen Darstellung aller Aminosäuren zur optimalen Einstellung [42].

Die Phenylketonurie wird also diagnostiziert durch Nachweis eines erhöhten Phenylalanin-Blutspiegels; die diätetische Einstellung wird kontrolliert durch Nachweis eines normalisierten Blutspiegels.

B DIE WICHTIGSTEN PHENYLALANIN-BESTIMMUNGSMETHODEN IM BLUT

Aus diesen Vorbemerkungen ergibt sich die Frage, wie der Phenylalanin-Spiegel im Blut am zweckmäßigsten zu messen ist. Ein kurzer Überblick schildert die wichtigsten Methoden.

1. Kolorimetrische Methode nach KAPELLER und ADLER [37]

Bei der 1932 angegebenen Methode handelt es sich um eine kolorimetrische Mikrobestimmung von Phenylalanin, die auf einer Nitrierung des Phenylalanins zu 3,4-Dinitrobenzoesäure und einer Überführung der gebildeten Verbindung durch Hydroxylamin in Gegenwart von Ammoniak in das blauviolett gefärbte Ammoniumsalz der o-diaci-Dihydrodinitrobenzoesäure beruht. Die Empfindlichkeit soll 0,1 mg, die Bestimmungsbreite 1-4 mg, der Fehler 5-8 % betragen. Die Methode erscheint im Vergleich zu heutigen Methoden zu unspezifisch. Sie wurde 1937 von KUHN und DESNELLE modifiziert [39]. Für große Reihenuntersuchungen eignet sie sich nicht.

2. Mikrobiologische Methode nach HENDERSON und SNELL [29]

Die 1948 angegebene Methode benutzt ein einziges Medium zur Bestimmung von 14 verschiedenen Aminosäuren. Verschiedene Milchsäure bildende Bakterien werden verwendet, z.B.: Lactobac. arabinosus, Stamm 17-5; Streptococ. faecalis, Stamm R;

Leuconostoc mesenteroides, Stamm P-60; Lactobac. casei, L.delbrueckii, Stämme 5 und 3; L. fermentii, Stamm 36. Durch pH-metrische Bestimmung der Milchsäureentstehung können die Aminosäuren eines Eiweißhydrolysates analysiert werden. In demselben Jahr wurde von den genannten Autoren eine entsprechende Mikromethode angegeben, die mit gleicher Präzision wie die Makromethode arbeitet [30]. Beide Methoden sind für große Reihenuntersuchungen nicht geeignet.

3. Säulenchromatographische Methode nach MOORE und STEIN [48-51]

Die 1951 angegebene, 1954 und 1958 von den Autoren modifizierte Methode zur Bestimmung aller Aminosäuren im Plasma ist zwar zur quantitativen Stoffwechselkontrolle der diätetischen Einstellung der PKU das optimale Verfahren, jedoch für Massentestungen ungeeignet.

4. Enzymatische Methode nach UDENFRIEND und COOPER [55]

Die Methode wurde 1953 zur Bestimmung von l-Phenylalanin in Geweben und Eiweißhydrolysaten angegeben. Eine mittels Azeton getrocknete Präparation von Streptococ. faecal. R wird zur Decarboxylierung von l-Phenylalanin benutzt. Anschließend folgt eine colorimetrische Bestimmung des Decarboxylierungsproduktes Phenyläthylamin mit Methylorange. Da in dem Streptococ.faecal. R-Pulver auch Tyrosin-Decarboxylase vorhanden ist, muß das gleichfalls gebildete Tyramin durch Extraktion abgetrennt werden. Es ist eine der besten Methoden, jedoch für Massentestungen ebenfalls zu aufwendig.

5. Papierchromatographische Methode nach BERRY [6]

Bei der 1957 angegebenen Methode werden zur chromatographischen Bestimmung von Phenylalanin Proben von 0,5 ml Serum mit 4 Volumeneinheiten 95 %igen Äthylalkohols enteiweißt und das Filtrat zur Herstellung des Chromatogrammes benutzt. Die Streubreite bei der Wiederbestimmung bekannter zum Serum zugefügter Phenylalaninmengen liegt zwischen 80 und 106 % mit einem Mittelwert von 95 %. Die Methode wurde zur Untersuchung und Kontrolle von Phenylketonurikern, die auf phenylalaninarme Diät eingestellt werden sollten, verwendet. Für Massentestungen ist sie gleichfalls zu aufwendig.

6. Enzymatisch spektrophotometrische Methode nach LA DU u.MICHAEL [40]

Die Methode wurde 1960 beschrieben und beruht auf der Oxydation von l-Phenylalanin zu Phenylbrenztraubensäure durch das Schlangengift von Crotalus adamanteus, welches l-Aminosäurenoxydase enthält. Die Ketosäure wird in Gegenwart von Arsenat- und Borationen in einen Enol-Borat-Komplex eingebaut. Der Komplex hat im UV-Licht eine hohe Absorption. Die l-Aminosäurenoxydase katalysiert jedoch auch die Oxydation anderer Aminosäuren im Serum, die ebenfalls stark absorbierende Enol-Borat-Komplexe bilden. Das Endresultat wird daher aus den Absorptionswerten bei drei verschiedenen Wellenlängen berechnet. Die Grenzen der Methode liegen: a) im Schlangengift, das in den verschiedenen Chargen unterschiedliche Aktivität der Aminosäurenoxydase enthält [12], b) in der Tatsache, daß mit nicht enteiweißtem Serum gearbeitet wird: Die Serum-Proteine haben eine hohe Absorptionsrate im UV-Bereich und neigen zum Ausfällen. Dadurch wird die benutzte Serummenge nach unten eingeschränkt, außerdem leidet die Empfindlichkeit des Testes, c) darin, daß heparinisiertes Blut und Citratblut zur Untersuchung ungeeignet sind, und d) in der Unbestimmbarkeit von hämolytischen Seren. Von diesen Nachteilen abgesehen, ist die Methode relativ rasch, spezifisch und genau und daher sowohl zur endgültigen Diagnose von PKU-Verdachtsfällen als auch zur Überwachung einer Behandlung mit phenylalaninarmer Diät geeignet, jedoch nicht zu Massentestungen.

1963 wurde von LA DU und Mitarbeitern eine Mikromethode als Modifikation [41] der 1960 beschriebenen Methode angegeben. Die Möglichkeit zur Bestimmung kleiner Blutmengen (o,1 ml durch Fersenpunktion erhaltenes Vollblut) wird dadurch gegeben, daß die Blutprobe vor dem Zentrifugieren mit 7 %iger Perchlorsäure enteiweißt wird, ein Schritt, der bei der alten Methode noch wegfiel. Dadurch wird es auch möglich, bereits hämolytisches oder für die alte Methode zu trübes Plasma oder Serum zu analysieren. Außerdem wird heparinisiertes Blut benutzt. Das Prinzip ist sonst das gleiche wie bei der Makromethode. Daher ergeben sich sonst die gleichen Indikationen wie bei der alten Methode. Für Massentestungen eignet sich die Methode ebenfalls nicht. Eine weitere Modifikation der LA DU-Methode wurde 1964 von WOOLF und GOODWIN beschrieben [60]. Sie bringt folgende Verbesserung:

Durch Ultrazentrifugierung werden die Serum- und Plasmaproteine beseitigt und dadurch die nicht spezifische Absorption (siehe Nachteile der LA DU-Methode) reduziert und die Empfindlichkeit und Genauigkeit der Methode erhöht.

7. Fluorimetrische Methode nach Mc CAMAN und ROBINS [44]

Die 1962 beschriebene Methode basiert auf der Beobachtung, daß die bei der Reaktion von Phenylalanin und Ninhydrin auftretende Fluoreszenz durch das Peptid l-Leucyl-l-Alanin hochgradig verstärkt wird. Die Methode erlaubt quantitative Phenylalaninbestimmungen in Gegenwart oder Abwesenheit anderer Aminosäuren bei einer Endkonzentration von 10^{-7} M. Unter den beschriebenen Bedingungen werden pro Analyse nur 5 µl normalen Serums benötigt. (Andere quantitative Methoden benötigen mindestens 100 µl für jede Bestimmung). Die Ergebnisse stimmen gut mit den Ergebnissen anderer Methoden überein. Für Massentestungen ist die Methode erst nach ihrer Automatisierung geeignet, die z.Zt. entwickelt wird [31].

8. Mikrobiologischer Hemmtest nach GUTHRIE und SUSI [18 ff.]

Dieser 1960 erstmals beschriebene Test erschien uns unter den genannten Methoden von besonderem Interesse, da er sich mit sehr wenig Untersuchungsmaterial durchführen läßt (nur Blutstropfen) und nach den bisherigen Unterlagen genügend einfach, sensitiv und spezifisch erscheint,um sich sowohl für Massentestungen als auch für Diät-Kontrollen zu eignen.

Z W E I T E R T E I L

A METHODIK DES GUTHRIE-TESTES

1. Prinzip

Durch kompetitive Hemmung zwischen Phenylalanin und seinem chemischen Antagonisten ß-2-Thienylalanin [46] wird je nach Konzentration der beiden chemischen Substanzen das Auskeimen von Bac.subt.-Sporen ATCC 6051 (American type culture collection, strain 6051)in einem Agar-Zucker-Salz-Minimalmedium gefördert oder gehemmt (analog der lange bekannten kompetitiven Hemmung zwischen den Sulfanilamiden und p-Aminobenzoesäure) [18]. Die

durch ß-2-Thienylalanin erfolgte Hemmung der Sporenkeimung wird außer durch Phenylalanin durch Phenylbrenztraubensäure und Phenylmilchsäure aufgehoben. Diese Entdeckung erlaubte die Entwicklung eines einfachen mikrobiologischen Agardiffusionstestes auf Phenylketonurie (PKU), wobei kleine mit einem Blutstropfen getränkte Filterpapierstückchen auf die Oberfläche des Agarkulturmediums gesetzt werden.

Schon BEYERINCK beschrieb 1889 in der sog. Auxanographiemethode die Möglichkeit mikrobiologischer Bestimmungen wasserlöslicher essentieller Substanzen durch Hydrodiffusion, wenn sie auf einen Gelatine- oder gereinigten durchsichtigen Agar-Agar-Nährboden gebracht werden, dem die betreffende Substanz zum Wachstum der vorher zugesetzten Bakterien fehlt. Umgekehrt wies er auf die wachstumshemmende Wirkung toxischer und antiseptischer Substanzen in der Umgebung des Applikationsortes auf einem sonst gleichförmiges Wachstum zeigenden halbfesten oder festen Nährboden hin [7].

2. Praktische Ausführung

a) Gewinnung der Blutproben

α) Nach Fersenpunktion wird ein großer Blutstropfen des Säuglings (bei Kleinkindern oder älteren Individuen entsprechend nach Fingerbeeren- oder Ohrläppchenpunktion) auf ein Stück dickes, sehr absorptionsfähiges Filterpapier gebracht (Schleicher & Schüll Nr.903). Der Blutfleck soll nach Lufttrocknung mindestens einen Durchmesser von 8 mm haben (aber nicht mehr als 12 mm) und nahe genug am Rand des Filterpapieres sitzen, um ein leichtes Ausstanzen mit einem Papierlocher zu erlauben. Das angegebene Filterpapier ist so absorptionsfähig, daß auch das sehr visköse Blut junger Säuglinge das Papier durchdringt, so daß der Blutfleck von beiden Seiten gleich erscheint. Diese Bedingungen müssen gegeben sein, um gleichmäßige Blutproben nach Ausstanzen mit dem Papierlocher zu erhalten.

ß) Um die Gewinnung der Blutproben möglichst einfach zu gestalten, wurden die auf Seite 7 in Abb.1 gezeigten Testkärtchen gedruckt, die am Kopfende aus Filterpapier (S & S 903) bestehen. Auf dem Filterpapier befinden sich 3 vorgedruckte Kreise, die vollständig mit je <u>einem</u> großen Blutstropfen zu durchtränken sind. Darunter finden sich Sparten für Personalangaben sowie

klinische Daten, welche Auskunft über Reifgeburt, Frühgeburt, Asphyxie, starken Ikterus, Antibiotika- bzw. Sulfonamidtherapie geben sollen. Diese Fragen sind von Bedeutung, weil durch Antibiotika und Sulfonamide im Blut evtl. zu niedrige Phenylalaninspiegel mit dem Test vorgetäuscht werden können. Überhöhte Phenylalanin-Blutspiegel bei Asphyxie, Ikterus und vor allem bei Frühgeborenen wurden von LA DU und HOWELL und auch von HSIA beschrieben [32,33].

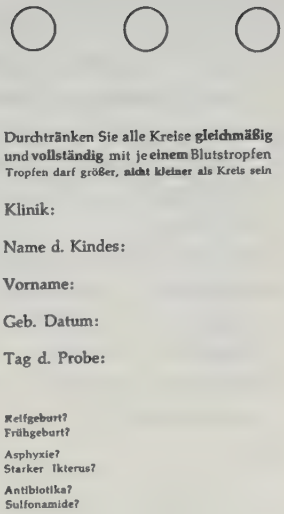

Abb.1 Testkärtchen mit Filterpapier-Kopf zur Gewinnung der Blutproben

γ) Vor der Untersuchung werden die einzelnen blutgetränkten Testkärtchen nebeneinander auf einen Drahtrost gelegt und so autoklaviert. GUTHRIE gibt einen Autoklavierdruck von 15 Pfund pro Quadratinch für drei Minuten an. (1 US-Pound avoir dupois = 0,453 kg; 1 inch = 2,5 cm). Die amerikanische Angabe entspricht also 6,75 kg pro 6,25 cm^2 = 1,08 kg pro cm^2. Das entspricht ungefähr 1 Atmosphäre.

Da die Temperatur dabei nach persönlicher Mitteilung GUTHRIE's [28] ungefähr 120° C beträgt, handelt es sich also um ungesättigten bzw. überhitzten Dampf (Dampfspannung des Wassers bei 99° C = 1 Atm.; bei 119° C = 2 Atm.). Der von mir benutzte Kliniksautoklav (Fa.Küster) arbeitet mit 2,5 kg pro cm^2 bei einer Sterilisierzeit von 5 Minuten. Die Temperatur beträgt dabei 120° C. Er ist überdies vollautomatisch und daher im Autoklaviervorgang zeitlich nicht willkürlich begrenzbar. Trotz dieser anderen technischen Daten erwies er sich als brauchbar. Das Autoklavieren verhindert nach Angaben GUTHRIE's [19,21] eine spätere Diffusion des Blutfarbstoffes von den Filterpapierstückchen in den Agar während des Bebrütens. Dadurch könnten evtl. Wachstumszonen maskiert werden. Bei zu langem Autoklavieren wird das Phenylalanin zerstört.

b) Herstellung des Mediums

GUTHRIE und Mitarbeiter machen dazu folgende Angaben [21]:

DEMAIN's Medium (modifiziert)
zur Auskeimung von Bacillus-subtilis-Sporen [14]

Substanz	Gramm	Gramm/Liter
Dextrose	20,0	
K_2HPO_4	30,0	
KH_2PO_4	10,0	
NH_4Cl	5,0	
NH_4NO_3	1,0	
Na_2SO_4	1,0	
Glutaminsäure	1,0	
Asparagin	1,0	
l-Alanin	0,5	
Salzlösung (10 ml)		
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$		10,0
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$		1,0
$FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$		1,0
$CaCl_2$		0,5

Das obige Nährbodenrezept ist eine Modifikation des von DEMAIN angegebenen. Die in der Tabelle aufgeführten Substanzen werden (mit Ausnahme der Dextrose) in 900 ml destillierten Wassers gelöst. Der pH soll 6,8-7,0 betragen. Je 90 ml der Lösung werden in 10 mindestens 200 cm^3 fassende Flaschen verteilt und durch Autoklavieren sterilisiert. Eine 20 %ige Dextroselösung wird getrennt sterilisiert, wovon jeweils 10 ml für jede Flasche zur Ergänzung des Mediums dienen. Dann werden ähnliche Flaschen mit 100 ml 3 %igem Agar gefüllt und ebenfalls sterilisert. Vor Gebrauch wird die Dextroselösung zugegossen und 100 ml Medium mit 100 ml vorher verflüssigtem und auf 55° C im Wasserbad abgekühltem Agar vermischt. Diese Vorschrift wurde im Verlauf der vorliegenden Untersuchung folgendermaßen modifiziert:

Die angegebenen Substanzen wurden statt in 900 ml in 500 ml aq. dest. gelöst und die Lösung bis zum Gebrauch unsteril bei 2 - 4° C im Kühlschrank gelagert. (Da die Lösung innerhalb von 14 Tagen verbraucht wurde, genügten diese Temperaturen; bei

längerer Lagerung empfiehlt es sich, die Lösung gefroren zu lagern). Vor Gebrauch wurden 50 ml der Lösung in einer ca. 250 cm^3 fassenden Flasche in ein Wasserbad von 55° C gebracht. Inzwischen wurde in einer anderen hitzebeständigen Flasche 2,5 g gereinigter Merck-Agar (Best.Nr.1614) mit 150 ml aq.dest. etwa 1 Stunde in ein siedendes Wasserbad gesetzt. Der Agar wurde in trockenem Zustand in 2,5-g-Portionen in kleinen verschließbaren Gläschen gelagert.

Statt der oben angegebenen Dextroselösung wurden ebenfalls in kleine gut verschließbare Gläschen abgewogene 2-g-Dextrose-Trockenportionen benutzt, von denen der Inhalt eines Gläschens bei Herstellung eines Testes zum Medium gegeben wurde. Beim Zusammengießen von Medium und Agarlösung war also die angegebene Gesamtmenge von 200 cm^3 wieder erreicht. Zuweilen kam es vor, daß das Medium für mehrere Stunden bei 55° C im Wasserbad blieb, bevor die Agarplatte gegossen wurde. Eine dabei auftretende gelbe Verfärbung des Mediums ließ sich vermeiden, wenn die Dextrose erst unmittelbar vor Gießen der Platte dem Medium zugesetzt wurde. Die Verfärbung des Mediums führte jedoch nicht zu einer Beeinträchtigung seiner Qualität.

Die geschilderte Modifikation ist zeitsparend, da einmal das Autoklavieren der Flüssigkeiten wegfiel und zum anderen der Merck-Agar in 150 cm^3 Lösungsmittel statt in 100 cm^3 nicht erst nach mindestens 2 Stunden Kochzeit, sondern schon nach ca. 1 Stunde geschmolzen war. Der Import des schneller schmelzenden amerikanischen Difco-Bacto-Agar ließ sich so vermeiden. Um den Agar schneller zum Schmelzen zu bringen, wurde dem Lösungsmittel außerdem statt 3 g nur 2,5 g Agar zugesetzt, was sich ebenfalls als ausreichend für die Konsistenz des Mediums erwies. Die Modifikation stellte sich noch in anderer Hinsicht als vorteilhaft heraus: Nach 16 Stunden Bebrütungszeit wurden in dem nicht autoklavierten Medium dichtere und größere Wachstumszonen als vorher im autoklavierten Medium erzielt. Danach scheint das Autoklavieren die Wachstumspotenz des Mediums zu reduzieren. Störende Verunreinigungen mit Fremdkeimen ließen sich bei der unsterilen Arbeitstechnik nicht beobachten.

c) Sporenpräparation

Die folgenden Arbeiten wurden unter sterilen Kautelen durchgeführt: Petrischalen wurden mit einem Kartoffel-Aufguß-Agar-Medium beschickt, welches folgendermaßen hergestellt wurde:

Kartoffel-Aufguß-Agar-Medium [19]:

Rohe Kartoffeln schälen, zerschneiden, wiegen.
Genügend Wasser hinzufügen, so daß sie bedeckt sind.
Kochen, bis sie weich sind und zerbröckeln.
Das Ganze durch ein sehr grobporiges Tuch (z.B. Mull) sieben (durch mehrere Lagen), um grobe Stücke auszuschließen.
Auf das 10fache des ursprünglichen Gewichtes verdünnen.
1 1/2 % Agar hinzufügen.
0,1 % Hefeextrakt hinzufügen (wir benutzten anfangs Brauereihefe, später Bäckerhefe).
Das Ganze kochen und nach Lösen des Agars in eine große Petrischale gießen.

Die Agaroberfläche wurde intensiv mit einer Bacillus-subtilis-ATCC-6051-Zellsuspension von über Nacht auf "Difco-Heart-Infusion"-Schrägagar gewachsenen Kulturen beimpft. Nach einer Bebrütungszeit von mindestens einer Woche bei 37° C wurden die Kulturen intervallmäßig mikroskopisch auf die Anwesenheit von Sporen untersucht.

Sporenfärbung zur mikroskopischen Untersuchung:

Ausstrichpräparat Hitze fixieren.
5 %ige Chromsäure 5 Min., abspülen.
Karbolfuchsin, 3 mal erhitzen (bis Blasenbildung), abspülen.
5 %ige Schwefelsäure 10 sec., schnell abspülen.
1 %ige Phosphormolybdänsäure 10 sec., abspülen.
Methylenblau 2 Min., abspülen, trocknen.

Die Sporen wurden vom Agar abgekratzt und mit physiologischer NaCl-Lösung abgewaschen. Dann wurden sie 3 - 4 mal mit physiolog. Kochsalzlösung durch Zentrifugierung gewaschen, jeweils nach 10 Min. Zentrifugieren die überstehende NaCl-Lösung abgegossen und neu mit Kochsalzlösung aufgefüllt. Die endgültige Suspension wurde in destilliertem Wasser colorimetrisch hergestellt bei einer Extinktion von 0,9 bei 550 mμ Wellenlänge. Die Suspension hielt sich bei 2-5° C im Kühlschrank bis jetzt über 1 Jahr.

Um das umständliche Arbeiten mit sterilen Pipetten nicht auf jeden Test auszudehnen, wurden jeweils 0,3 ml der obigen Suspension unter sterilen Kautelen in kleine, gut verschließbare Fläschchen pipettiert und im Kühlschrank bei 2-4° C gelagert. Die in der Originalmethode angegebene Sporentrocknung in einer

Schüttelmaschine bei 60° C erwies sich als nicht erforderlich. Bei Herstellung eines Testes wurde der Fläschcheninhalt in 200 ml Medium ausgegossen.

d) Der Hemmstoff ß-2-Thienylalanin

Es wurde eine 0,01 molare Lösung (MG = 171 g) hergestellt und bis zum Gebrauch gefroren aufbewahrt (beziehbar durch: "Sigma" chemical Company - USA). Bei Herstellung eines Testes wurden 0,3 ml der Hemmstofflösung in 200 ml Medium pipettiert, doch kann die Hemmstofflösung auch in kleine Schraubfläschchen jeweils in 0,3 ml-Mengen verbracht und dann getrocknet und bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden. Es muß dann vor Gebrauch 1-2 ml Medium in ein solches Schraubfläschchen gegeben und der getrocknete Hemmstoff mit einem kleinen Plastikstäbchen von Boden und Wand des Fläschchens abgelöst werden. Dann wird der Inhalt des Fläschchens in das Medium ausgegossen.

e) Herstellung der Phenylalanin-Standardwerte (Kontrollen)

Zu 200 ml Frischblut wurden 20 ml 5 %iges Natr.citr. zugesetzt. Zusätzlich wurden der gleichen Versuchsperson 5 ml Blut ohne Natr.citr.-Zugabe abgenommen. Mit Hilfe der LA DU-Makromethode [40] wurde von letzterem der Phenylalaningehalt bestimmt, welcher als Ausgangswert für die 220 ml Citratblut diente, wobei die Differenz zwischen Blut-und Serumwert unberücksichtigt blieb [54].

Zur Herstellung einer Kontrollreihe von 2; 4;4; 6;6; 8; 12; 20 mg% Phenylalanin wurden dem Blut entsprechende Mengen einer 1000 mg%igen Penylalaninlösung mit Hilfe von Mikropipetten zugesetzt. Das Blut war auf zwei 50-ml-Meßkolben (für die in doppelter Menge hergestellten 4 und 6 mg%-Werte) und 25-ml-Meßkolben dispensiert. Da die hinzugefügten Flüssigkeitsmengen sich in µl-Einheiten bewegten, konnte der Verdünnungsfaktor unberücksichtigt bleiben. Nun wurde das Blut mit Pipetten auf Filterpapier (Schleicher & Schüll Nr.903) getropft, so daß jeder Blutfleck einen Durchmesser zwischen 9 und 13 mm aufwies. Diese Kontrollflecken wurden 24 Stunden luftgetrocknet und dann mit einem Papierlocher ausgestanzt. Die ausgestanzten Kontrollstückchen wurden in beschriftete Polyäthylenbeutel verpackt und in einem Kühlraum bei 2° C im Exsikkator gelagert (als Exsikkationssubstanz benutzte ich Blau Gel: Merck-Best.Nr.1925).

Unter diesen Bedingungen gelagert, hielten sich die Kontrollen bisher 11 Monate, ohne an Wirksamkeit zu verlieren. Die Kontrollen wurden jeweils erst vor Herstellung eines Testes zusammen mit den unbekannten Blutproben autoklaviert. GUTHRIE macht keine Angaben über die Lagerung der Kontrollen in ausgestanztem Zustand. Ich fand jedoch diese Form der Lagerung am zweckmäßigsten, da ich so in einem normalgroßen Exsikkator eine sehr große Zahl von Kontrollen bequem unterbringen konnte.

f) Herstellung eines Testes

Nach Zusammengießen von 50 ml Medium und 150 ml Agarlösung, die beide inzwischen im Wasserbad eine Temperatur von 55° C erreicht hatten, sowie nach Zugabe von 0,3 ml Hemmstoff und 0,3 ml Sporensuspension wurde alles durch mehrmaliges Hin- und Hergießen des Flascheninhaltes gut gemischt und in eine ca. 18 mal 28 cm große, vorher mit Alkohol gereinigte, durchsichtige Plastikschale gegossen. Evtl. Blasen wurden mit Filterpapier aufgesaugt. Es stellte sich heraus, daß die Plastikschalen nach Reinigung mit Alkohol wieder verwendungsfähig waren. Reinigung mit Äther machte die Schalen trübe und undurchsichtig.

Nach Festwerden des Agar wurde die Plastikschale auf eine Papierschablone gesetzt, auf der in angemessenen Abständen Zahlen von 1 bis ca. 100 gedruckt waren. An der Basis der Schablone finden sich Marken für die Positionen der Phenylalanin-Standardwerte (Kontrollen).

Die inzwischen autoklavierten Testkärtchen wurden nun numeriert. Bei Nr. 1 beginnend wurde jeweils aus der Mitte eines Blutfleckes ein Filterpapierstückchen ausgestanzt und mit einer Pinzette auf den durchsichtigen Agar über die entsprechende Zahl der Schablone gesetzt. Es wurde bei Massentestungen meist nur einer der drei Blutflecken jedes Kärtchens ausgestanzt, die anderen beiden dienten evtl. zur Wiederholung. Bei Massentestungen benutzte ich eine Kontrollreihe von 2; 4;4; 6;6; 8; 12; 20 mg%. Bei Kontrolle der diätetischen Einstellung wandte ich zusätzlich noch einen zweiten 2-mg%-Wert an. Noch empfehlenswerter ist der Zusatz einer 1-mg%-Kontrolle - sie wird hergestellt von Blut eines zu streng mit phenylalaninarmer Diät behandelten Phenylketonurikers -, die in letzter Zeit in diesem Labor routinemäßig angewandt wird. Die Agarschale wurde über Nacht mit der Oberfläche nach unten in den Inkubator bei 37° C gestellt.

Nach einer Bebrütungszeit von 16 Stunden wurde am nächsten Morgen das Ergebnis abgelesen: Die weißen Trübungszonen um die Filterpapierstückchen wurden in mm gemessen und mit den Durchmessern der Wachstumshöfe der Kontrollstückchen verglichen.

3. Weitere methodische Untersuchungen

a) Agar-Agar

Ich untersuchte zunächst die Brauchbarkeit eines ungereinigten Nährbodenagars der Firma Riedel de Haën. Er zeigte sich in mehrfachen Versuchen trotz vierstündigen Kochens im Wasserbad in der angegebenen Konzentration von 3 g/200 cm^3 noch nicht gelöst. Zudem war er nicht durchsichtig, sondern braun, so daß ein Ablesen der Bakterienwachstumshöfe kaum möglich war. Ich ging daher zu dem oben genannten gereinigten Agar der Firma Merck über, der zwar auch nicht die rasche Löslichkeit des amerikanischen Difco-Agar besitzt, jedoch ebenso wie dieser einen glasklaren Nährboden liefert.

b) Filterpapier

Das für diese Methode geeignete Filterpapier muß eine gute Absorptionsfähigkeit und eine hochgradige Homogenität haben. Da die deutsche Firma Schleicher & Schüll das von GUTHRIE empfohlene Filterpapier Nr.903 nicht herstellte - es wurde bislang nur in der amerikanischen Zweiggesellschaft dieser Firma fabriziert -, wurde für die vorliegenden Untersuchungen die Sorte Nr.903 aus USA bezogen. Zwei anfänglich untersuchte Ersatzpapiere erwiesen sich als unbrauchbar. Inzwischen wird das Papier auch in Deutschland von Schleicher & Schüll hergestellt.

c) Größe der Blutflecken

Nach GUTHRIE's Angaben [21] sollen die Blutflecken nach Lufttrocknung mindestens 3/8 inch ≈ 9 mm und nicht mehr als 1/2 inch = 12,5 mm im Durchmesser betragen.

Da die deutschen Papierlocher Stückchen von 20 % kleinerem Durchmesser ausstanzen, nahm ich als untere Grenze 8 mm. Alle Blutproben, die ein nicht beidseitig gleichmäßig mit Blut durchtränktes ausgestanztes Filterpapier ergaben, wurden zurückgeschickt und neu angefordert. Ich habe daher über die Fehlerquelle zu kleiner Blutproben für Phenylalaninbestimmung kein ausreichendes Untersuchungsmaterial. PARTINGTON und SINNOTT[53]

fanden bei 888 zu kleinen Blutproben im Vergleich mit 1224 Blutproben der vorgeschriebenen Größe von reifen Neugeborenen signifikant kleinere Wachstumshöfe. Die Differenzen waren allerdings gering.

Nach GUTHRIE's Angaben zu seinem 1963 gedrehten Film [22] ist es wichtig, daß durch eine einzige Applikation die richtige Größe des Blutfleckes erreicht wird. Um dies zu prüfen, verglich ich bei 10 Neugeborenen jeweils auf der gleichen Testplatte eine Probe, die von einem einzigen Blutstropfen stammte, mit einer anderen von dem gleichen Neugeborenen, die durch Applikation mehrerer Tropfen entstanden war und dadurch weit über 2 cm im Durchmesser lag. Von den 10 Blutprobenpaaren zeigten 3 Paare zwischen ihren beiden Einzelblutproben keine Differenzen in den Durchmessern der Wachstumshöfe, 4 Paare zeigten 0,5 mm, 1 Paar zeigte 1,5 mm und 2 Paare zeigten 2 mm Unterschied zwischen den beiden Einzelblutproben. Dabei wiesen die Wachstumshöfe der Blutproben, die durch mehrere Applikationen entstanden waren, die größeren Durchmesser auf. Die Differenzen sind also minimal, können aber zuweilen die Ergebnisse um eine Stufe der Kontrollwerte nach oben verschieben (z.B. von 2 mg% auf 4 mg%).

d) Lagerung der Kontrollen

Da anfänglich kein Exsikkator zur Verfügung stand, lagerte ich einen Teil der Kontrollen in der Tiefkühltruhe (-20° C), einen Teil bei 2-4° C im Kühlschrank und einen weiteren Teil bei Zimmertemperatur. Schon nach 14tägiger Lagerung in der Tiefkühltruhe zeigten Phenylalanin-Wasser-Kontrollen (siehe unter B 1, Seite 17 : Untersuchung des Testes auf Spezifität) überhaupt kein Wachstum mehr, während Blutkontrollen auf der gleichen Testplatte normales Wachstum zeigten. Auch die Phenylalanin-Blutkontrollen zeigten bei gleicher Bebrütungszeit durchschnittlich 1-2 mm kleinere Durchmesser, wenn sie in der Tiefkühltruhe über 14 Tage gelagert waren. Bei Lagerung im Kühlschrank (2-4° C) nahmen die Durchmesser im Laufe der Zeit auch etwas ab. Das Gleiche fand sich bei Zimmertemperatur. Allerdings wurde sowohl bei Kühlschranklagerung als auch bei Zimmertemperatur-Lagerung die Abnahme der Wachstumshöfe erst nach etwa einem Monat deutlich.

Bei vorschriftsmäßiger Lagerung der Kontrollen in einem Exsikkator bei 2° C fand sich während einer bis jetzt 11monatigen

Beobachtungszeit keine Abnahme in den Durchmessern der Wachstumszonen. Dagegen zeigten im Exsikkator bei Zimmertemperatur gelagerte Proben gleich den nicht im Exsikkator bei Zimmertemperatur gelagerten Proben (s.o.) nach einem Monat einen leichten Wachstumsverlust: maximal 2,5 mm, durchschnittlich 1-2 mm kleinere Durchmesser. Nach 14 Tagen fand sich noch kein signifikanter Unterschied.

So bestätigte sich als optimale Lagerungsmöglichkeit für längere Zeiträume die von GUTHRIE angegebene im Exsikkator bei 2-4° C [21].

e) Medium-Zusammensetzung

Bei den ersten 20 Versuchen mit selbst hergestelltem Medium wuchsen die Kontrollreihen trotz verschiedener mg%-Werte alle mit dem gleichen Durchmesser, d.h. der 2-mg%-Wert war genau so groß gewachsen wie der 20-mg%-Wert. Kontrollversuche mit den gleichen Phenylalanin-Kontrollen ergaben auf amerikanischem "Test-Kit"-Medium gute Differenzierung zwischen den einzelnen Werten, so daß also der Fehler im Medium liegen mußte. Bei genauerer Nachforschung ergab sich, daß die benutzten Chemikalien teilweise in hydratisierter Form vorlagen. Es war Glukose·H_2O, $Na_2SO_3 \cdot 7\ H_2O$ und Asparagin·H_2O statt der reinen Substanzen benutzt worden, wodurch beim Auswiegen teilweise recht beträchtliche Unterdosierungen entstanden. Es mußten ausgewogen werden:

statt 1 g Na_2SO_3	2 g $Na_2SO_3 \cdot 7\ H_2O$
statt 1 g Asparagin	1,15 g Asparagin·H_2O
statt 1 g Glukose	1,1 g Glukose·H_2O

Nach Berücksichtigung dieser Fehler bei einem neu angesetzten Medium trat ein gut differenziertes Wachstum zwischen den verschiedenen Phenylalanin-Kontrollwerten auf. In keinem der späteren über 160 Versuche zeigte sich das genannte Phänomen wieder.

In seiner 1963 veröffentlichten Arbeit [21] bemerkt GUTHRIE, daß die doppelte Dextrose-Konzentration intensivere Wachstumszonen bringe. Ich benutzte zwar seit Bekanntwerden dieser Modifikation statt 1 g 2 g reine Glukose, fand aber keinen Unterschied in der Dichte und Größe der Wachstumszonen.

Tabelle 1

Dextrose-menge (g)	Kontrollwerte (mg %)								
	2	2	4	4	6	6	8	12	20
	Durchmesser (mm)								
1	11	11	13,5	13	16,5	16,5	18	22	25
2	10,5	10,5	13	13	16	15,5	18	22	25

Die kleinen Differenzen entsprechen der normalen Streubreite der Kontrollen (s. unter B 2b, Seite 23).

f) <u>Autoklav oder Heißluftsterilisator</u>

Die Unmöglichkeit, das Autoklavieren der Blutproben durch Heißluftsterilisation zu umgehen, möge folgender Vergleich zeigen:

Tabelle 2

Durchmesser der Kontrollen (auf der gleichen Testplatte) in mm nach 20stündiger Bebrütungszeit

Kontroll-werte (mg%)	Autoklav	Heißluftsteriligator 150°C - 20 Min.	Heißluftsteriligator 150°C - 45 Min.
2	16	21	21
4	17,5	22	23
6	19,5	22	24
8	22	22,5	22,5
12	23,5	26	24
20	28,5	26	24,5

Eine Tendenz zur Nivellierung der verschiedenen Werte durch Heißluftsterilisation ist unverkennbar. Nach 20 Min. Heißluftsterilisation zeigte sich noch deutliche Diffusion von Blutfarbstoff in das Medium in der Umgebung der Testblättchen. Da sich nach 45 Minuten praktisch jedoch keine Hb-Diffusion mehr zeigte, kann darin nicht die Ursache für die wenig unterschiedlichen Wachstumszonen liegen.

B ERGEBNISSE

1. Untersuchung des Testes auf Spezifität

Nach GUTHRIE kann der Hemmeffekt von ß-2-Thienylalanin außer durch Penylalanin auch durch Phenylmilchsäure und Phenylbrenztraubensäure aufgehoben werden [18,19,21]. Ursprünglich gab GUTHRIE auch Prolin als chemischen Antagonisten von ß-2-Thienylalanin an [18,19]. Inzwischen wurde diese Behauptung zurückgenommen [21]. Um diese Frage noch einmal zu klären und evtl. noch andere positive Substanzen zu finden, testete ich zahlreiche physiologische Aminosäuren und einige phenylalaninähnliche Substanzen gegen Phenylalaninkontrollen durch.

Dabei wurde folgende Versuchsanordnung gewählt:
20 mg%ige wässrige Lösungen der Aminosäuren Glykokoll, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Tyrosin, Serin, Threonin, Cystein, Cystin, Taurin, Methionin, Asparaginsäure, Asparagin, Glutaminsäure, Glutamin, Ornithin-HCl, Tryptophan, Prolin, Hydroxyprolin, Lysin-HCl, Arginin-HCl, Citrullin, Histidin-HCl wurden hergestellt. Von allen Lösungen wurden mit Mikropipetten auf kleine mit Papierlocher ausgestanzte Filterpapierstückchen (S & S Nr.903) jeweils 0,01 ml pipettiert und luftgetrocknet. Zusätzlich wurde aus einer Ampulle Thyroxin "Roche"(R) (Ampulle zu 1 ml enthält 1 mg Thyroxin) und einer Ampulle Suprarenin(R) [Ampulle zu 1 ml (Lösung 1:1000) enthält 1 mg Adrenalin] gleichfalls je 0,01 ml auf Filterpapierblättchen dispensiert.

Auf die gleiche Weise wurde eine Phenylalanin-Kontrollreihe aus wässrigen Lösungen von 2; 4; 6; 8; 10; 12 und 20 mg% Phenylalanin hergestellt. Die Filterpapierstückchen mit den zu untersuchenden Aminosäuren, sowie mit Thyroxin und Adrenalin, wurden nun jeweils in Doppelbestimmung auf eine Agarplatte gebracht, dazu an der Basis der Platte die Phenylalanin-Kontrollreihe aufgetragen. Keines der Filterpapierstückchen wurde vorher autoklaviert.

Nach 16 1/2-stündiger Bebrütungszeit bei 37° C zeigten alle Aminosäuren außer Phenylalanin, sowie Adrenalin und Thyroxin ein negatives Resultat, d.h. überhaupt kein Wachstum. Die Phenylalanin-Kontrollreihe dagegen zeigte folgende Durchmesser:

Tabelle 3

Phenylalanin in H_2O-Kontrollen
nach 16 1/2 stündiger Bebrütungszeit

Kontroll-werte (mg%)	2	4	6	8	10	12	20
Durchmesser (mm)	15	18	20	23	25	26	28

Daraus geht hervor, daß selbst bei zehnfacher Erhöhung der physiologischen Aminosäurenkonzentrationen im Serum bei den genannten Aminosäuren mit Ausnahme von Phenylalanin kein Wachstum auftritt und daß sich auch Prolin inaktiv verhält.

2) Untersuchung des Testes auf S e n s i t i v i t ä t

a) Untersuchung der Ergebnisse auf Reproduzierbarkeit

α) Vollblutproben

Über 50 Blutproben von auf phenylalaninarme Diät eingestellten Phenylketonurikern wurden teils auf verschiedenen Testplatten (Tab.4), teils auf der gleichen Platte (Tab.5) verglichen. Unter 2 mg% liegende identische Ergebnisse wurden nur teilweise aufgeführt. In Versuch I der Tab. 4 wurde jeweils die frische Blutprobe untersucht. Bei Versuch II und III wurden die bereits beim ersten Mal autoklavierten anderen beiden Bluttropfen der Testkärtchen benutzt, so daß hier die Bedingung, unbekannte Blutproben und Kontrollen in einem Arbeitsgang zu autoklavieren, nicht gegeben war. Allerdings arbeitet der benutzte Autoklav, wie schon angedeutet, automatisch, so daß zumindest annähernd gleiche Bedingungen herrschten. Versuch II wurde zwei, Versuch III drei Wochen nach dem ersten Versuch vorgenommen. Die autoklavierten Blutproben lagerten in der Zwischenzeit bei 2° C im Exsikkator.

Aus Tabelle 4 und 5 geht hervor, daß sowohl bei Mehrfachbestimmungen gleicher Proben auf verschiedenen Platten als auch auf der gleichen Platte Differenzen auftraten. Die Differenzen waren auf verschiedenen Platten im allgemeinen größer. Sie betrugen maximal 2 Stufen der Kontrollwerte: Nr.15 und 17 der Tab. 4. Aber auch auf der gleichen Platte traten Differenzen von maximal einer Stufe der Kontrollwerte auf: Nr.7 der Tab. 5.

Tabelle 4

Gleiche Blutproben auf verschiedenen Testplatten
mg% Phenylalanin im Blut

lfd. Nr.	Versuch I	Versuch II	Versuch III
1	>20	20	-
2	>20	>20	-
3	>20	>20	>20
4	20	20	-
5	20	-	12-20
6	12-20	12-20	12-20
7	12-20	12-20	-
8	12-20	12	-
9	12-20	-	12-20
10	12-20	20	-
11	12	12	-
12	12	12-20	20
13	8-12	8-12	-
14	8-12	12-20	-
15	8-12	6	6- 8
16	8-12	-	8-12
17	8-12	20	-
18	8-12	8	-
19	8	12	8
20	8	6	6
21	8	6- 8	-
22	6- 8	-	4
23	6	6- 8	-
24	6	6	6
25	6	4- 6	-
26	6	6	-
27	6	4	-
28	4- 6	4- 6	-
29	4	4	-
30	2	4	-
31	2	<2	2- 4
32	2	2	<2
33	<2	<2	-
34	<2	<2	<2
35	<2	<2	<2
36	<2	2- 4	<2
37	<2	<2	<2
38	<2	<2	2
39	<2	2	2

Zeichenerklärung: - = keine Untersuchung

Tabelle 5

Gleiche Blutproben auf gleichen Testplatten

lfd. Nr. der Probanden	lfd. Nr. der Blutproben I mg%Ph	Ø	II mg%Ph	Ø	III mg%Ph	Ø	IV mg%Ph	Ø	V mg%Ph	Ø	VI mg%Ph	Ø	VII mg%Ph	Ø	VIII mg%Ph	Ø	IX mg%Ph	Ø	X mg%Ph	Ø
1	> 20	25	20	24	—		—		—		—		—		—		—		—	
2	8-12	21	12	22	—		—		—		—		—		—		—		—	
3	8	19	6- 8	18	—		—		—		—		—		—		—		—	
4	4- 6	15	4- 6	15	—		—		—		—		—		—		—		—	
5	< 2	11	< 2	11	—		—		—		—		—		—		—		—	
6	< 2	11	< 2	10	—		—		—		—		—		—		—		—	
7	< 2	11	2- 4	12	< 2	11	2- 4	12	< 2	10,5	< 2	10	< 2	10	< 2	10	< 2	10	< 2	10
8	< 2	11	< 2	11	< 2	11	< 2	11	< 2	11	< 2	11	—		—		—		—	
9	< 2	9	< 2	9	—		—		—		—		—		—		—		—	
10	< 2	8	< 2	8	—		—		—		—		—		—		—		—	

Zeichenerklärung: Ph = Phenylalanin; Ø = Durchmesser in mm; - = keine Untersuchung

Kontrollen

mg%Ph	2	4	6	8	12	20
Ø	11,5	14	16,5	19	22	24

Die Differenzen fallen bei niedrigen Werten weniger ins Gewicht als bei hohen, da die mg%-Abstände bei den hohen Kontrollwerten wesentlich größer sind. Außerdem fanden sich bei niedrigen Werten allgemein geringere Schwankungen. Nur zum Teil ließen sich die Unterschiede bei Mehrfachbestimmungen mit unterschiedlich großen Blutflecken (s. A 3c, Seite 13f) erklären. Auch an Unterschiede beim Autoklavieren ist trotz automatischen Ablaufs zu denken. Schließlich muß die normale Streubreite der Kontrollen berücksichtigt werden (s. B 2b, Seite 23).

ß) Serumproben

Es wurde versucht, die oben genannten Differenzen durch Benutzung von Serumproben zu verringern. Zitratfreies Frischblut wurde zentrifugiert und der Phenylalaningehalt des Serums mit der LA DU-Methode bestimmt. Durch Phenylalanin-Zugabe wurden Serumkonzentrationen von 1; 2; 4; 6; 8; 10; 12 und 20 mg% hergestellt (Ausgangswert des Serums: 1,0 mg%). Wie bei der Spezifitätsuntersuchung (B 2, Seite 17) wurden auf ausgestanzte Filterpapierstückchen von jeder Serumkonzentration 0,01 ml mit Mikropipetten aufgetragen. In der gleichen Weise wurden die Seren von Phenylketonurikern behandelt. Medium, Sporen und Hemmstoff wurden in gleicher Zusammensetzung und Konzentration wie bei einem Test mit Blutproben benutzt. Der Autoklaviervorgang fiel weg.

Tabelle 6 zeigt an 16 verschiedenen Beispielen, inwieweit sich mit dieser etwas exakteren Modifikation des GUTHRIE-Testes identische Ergebnisse auf verschiedenen Platten erzielen lassen.

Es fanden sich auch diesmal teilweise recht erhebliche Differenzen von maximal 3 Stufen der Kontrollwerte (Nr.14 und Nr.15 in Tabelle 6), welche noch über den Differenzen des Bluttestes liegen. Der Hauptgrund hierfür liegt in der schlechten Haltbarkeit der Kontrollen, die schon nach zweiwöchiger Lagerung im Bereich der höheren Phenylalanin-Konzentrationen eine deutliche Wachstumsabnahme zeigten (weiteres s. B 2c, Seite 24). Das hatte zur Folge, daß die unbekannten frisch hergestellten Serumproben bei Vergleich mit alten Kontrollen (A) zu hohe Werte erhielten. Wiederholungsversuche mit frisch hergestellten Kontrollen (ohne die Kennbuchstaben A und Z) zeigen die Unterschiede (Tab. 6).

Tabelle 6

Vergleich der Ergebnisse gleicher Serumproben auf verschiedenen Testplatten (Versuche I-IV)

	GUTHRIE-Serumtest (mg% Phenylalanin)			
lfd.Nr.	Versuch I	Versuch II	Versuch III	Versuch IV
1	> 20	> 20	> 20	-
2	20	> 20	20	-
3	12-20	12-20	12-20	-
4	8-12	12	8-12	8-10
5	6	8	-	-
6	1- 2	1- 2	1- 2	-
7	1- 2	1- 2	1- 2	-
8	1- 2	1- 2	1- 2	-
9	2- 4 A	1- 2	1- 2	-
10	1- 2	1- 2	1- 2 A	-
11	1- 2	< 1	<1 A	-
12	8-12 Z	12-20 Z	20 Z	-
13	8-12 A, Z	8-12 A, Z	6- 8	8
14	8-12 A, Z	>20 A, Z	8-12	8
15	4- 8	12-20 A, Z	12-20 A, Z	4- 8
16	2 A	2- 4	2- 4 Z	-

Zeichenerklärung:

A = alte Kontrollen
Z = zusammengewachsene Wachstumszonen
- = keine Untersuchung

Ein zweiter Grund für die weniger gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit dem Serumtest liegt in der Tendenz der Wachstumszonen, bei genügender Größe mit der Nachbarzone zusammenzuwachsen. Auch dadurch kamen häufig Vergrößerungen von Wachstumszonen zustande. Vor allem bei Zusammenwachsen verschieden großer Wachstumszonen nahmen die kleineren an Größe zu. Bei Benutzung des Vollbluttestes kam Zusammenwachsen von verschiedenen Wachstumszonen wesentlich seltener vor, da die Proben durch das Autoklavieren Phenylalanin verloren und dadurch bei gleicher oder sogar etwas längerer Bebrütungszeit kleinere Wachstumshöfe ergaben als die entsprechenden Serumproben.

Ein dritter Grund ist in der Tatsache zu suchen, daß länger

gefroren gelagerte Seren teilweise Eiweißausfällungen zeigten und dadurch zu Pipettierfehlern führten, wenn sie nicht vorher filtriert wurden.

b) Streuung der Phenylalanin-Kontrollen

Ein Maßstab für die Streubreite der Ergebnisse von gleichen Blut- und Serumproben läßt sich durch die Untersuchung der Kontrollen gewinnen.

α) Vollblutkontrollen

Aus über 100 unter den gleichen Bedingungen durchgeführten Untersuchungen wurden wahllos 20-40 Beobachtungen jedes Kontrollwertes herausgegriffen (Bebrütungszeit: 16 Stunden).

Tabelle 7

V o l l b l u t k o n t r o l l e n

Vollblut-kontroll-werte (mg%)	Zahl der Beobachtungen	Durchmesser der Wachstumshöfe (mm)		
		Variations-breite	Mittelwerte	σ
2	26	11 - 13	11,6	± 0,65
4	40	12,5 - 16	13,9	± 0,96
6	40	14 - 19	16,4	± 1,20
8	20	16 - 21	18,3	± 1,37
12	20	18 - 23	20,9	± 1,35
20	20	22 - 26	24,6	± 1,04

Zeichenerklärung: σ = Standardabweichung

Die größte Streuung fand sich bei den Kontrollwerten 6; 8; 12 und 20 mg%, die geringste bei 2 und 4 mg%. Diese Beobachtung stimmt gut mit der unter B 2a, Seite 21, gemachten Feststellung überein, daß sich bei niedrigen Phenylalanin-Konzentrationen allgemein geringere Schwankungen bei Mehrfachbestimmungen zeigten.

ß) Serumkontrollen

Die Mittelwerte der Wachstumszonendurchmesser wurden von 9 bzw. 6 Testen mit verschiedenen Serumkontrollen bestimmt (Bebrütungszeit: 15 Stunden) und die Standardabweichung σ errechnet. Alle Kontrollen waren bereits 2 - 4 Wochen bei Zimmertemperatur im Exsikkator gelagert.

Tabelle 8

S e r u m k o n t r o l l e n

Serum-kontroll-werte (mg%)	Zahl der Beobachtungen	Durchmesser der Wachstumshöfe (mm)		
		Variations-breite	Mittelwerte	σ
1	9	8,5 - 11,0	9,5	± 0,87
2	9	12,0 - 14,5	13,4	± 0,88
4	9	15,0 - 17,5	16,7	± 0,83
8	6	16,5 - 18,0	18,1	± 0,76
12	6	19,0 - 20,0	19,5	± 0,55
20	6	19,5 - 21,0	20,1	± 0,59

Zeichenerklärung: σ = Standardabweichung

Die Standardabweichungen lagen alle unter ± 1 mm, d.h. niedriger als bei den Vollblutkontrollen. Die Ursachen hierfür liegen vermutlich teils in den quantitativ genau vergleichbaren Serummengen auf den Testplättchen von jeweils 0,01 ml, teils im Wegfall des Autoklaviervorganges, aber wohl auch in der kleineren Beobachtungszahl.

c) Meßbereich der Kontrollen

α) Serumkontrollen

Der kleineren Streuung der Serumkontrollen stand eine im Laufe der Zeit zunehmend geringer werdende Differenz der Wachstumshofdurchmesser der höheren Kontrollwerte, vor allem zwischen den 12 und 20 mg%-Werten, gegenüber, so daß oft eine scharfe Trennung nicht mehr möglich war. Die in Tab. 8 wiedergegebenen Beobachtungen stammten - wie schon erwähnt - alle von bereits 2 bis 4 Wochen bei Zimmertemperatur im Exsikkator gelagerten Kontrollen. Daß sich die mittleren Wachstumszonendurchmesser der hohen Kontrollwerte wieder nach oben verschoben, wenn die Kontrollen nur wenige Stunden gelagert waren, zeigen die Tabellen 9 und 10.

Zur besseren Veranschaulichung der genannten Beobachtungen dient Abbildung 2, aus der auch gleichzeitig der Meßbereich des Testes ersichtlich ist (s. Seite 26).

Tabelle 9
4 Beobachtungen an nur wenige Stunden gelagerten Kontrollen
(Bebrütungszeit: 15 Stunden)

Serumkontroll-werte (mg%)	Durchmesser der Wachstumshöfe (mm)		
	Variationsbreite	Mittelwerte	σ
1	8,5-- 9,5	8,8	± 0,58
2	13,5 - 14,5	13,8	± 0,58
4	17,0 - 17,5	17,2	± 0,29
8	18,5 - 19,5	19,0	± 0,50
12	21,0 - 21,5	21,4	± 0,30
20	23,5 - 24,5	24,0	± 0,50

Tabelle 10
3 Beobachtungen an nur wenige Stunden gelagerten Kontrollen
(Bebrütungszeit: 18 Stunden)

Serumkontroll-werte (mg%)	Durchmesser der Wachstumshöfe (mm)		
	Variationsbreite	Mittelwerte	σ
2	18,0 - 19,0	18,3	± 0,58
4	22,0 - 22,0	22,0	± 0,00
6	23,0 - 24,0	23,7	± 0,58
8	24,5 - 25,5	25,2	± 0,58
10	26,5 - 27,5	27,2	± 0,58
12	28,0 - 29,0	28,5	± 0,50
20	30,0 - 30,5	30,3	± 0,29

Kurve II gibt die Verhältnisse der Tabelle 8 wieder. Die Kurven III und IV entsprechen den Tabellen 9 und 10. Kurve I zeigt die mittleren Wachstumszonendurchmesser und die zweifachen Standardabweichungen der Vollblutkontrollen (siehe Tab. 7 und Abschnitt B). Aus den unterschiedlichen Steigungen der Kurve II und III, weniger deutlich der Kurve IV, ist die Bedeutung des Alters der Kontrollen im Bereich der hohen Serum-Phenylalanin-Konzentrationen ersichtlich. Wenig unterschiedlich erscheinen die Steigungen im Bereich von 1 bis etwa 8 mg%.

Werden nur die Kurven der frisch hergestellten Serumkontrollen berücksichtigt, so wird deutlich, daß bei beiden

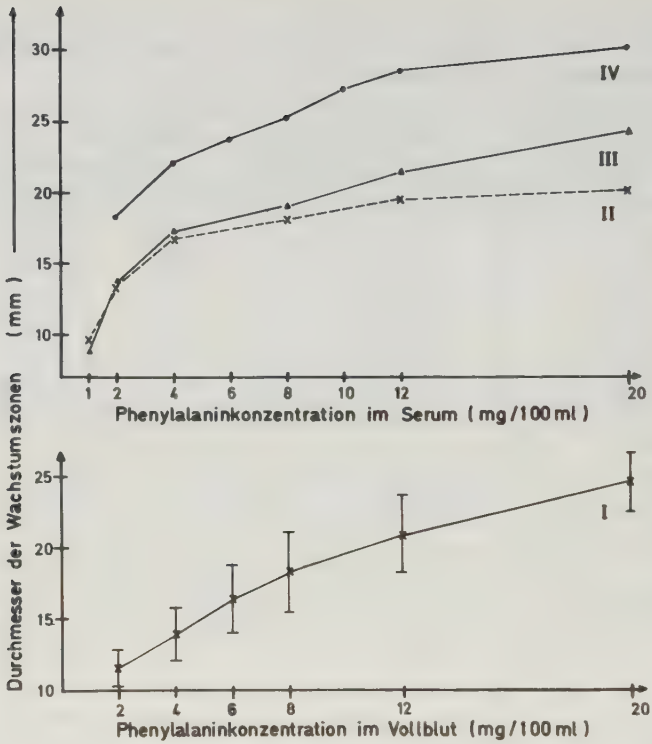

Abb.2 Durchmesser der Wachstumszonen der Vollblut- und Serumkontrollen in Abhängigkeit vom Vollblut- bzw. Serum - Phenylalaningehalt

Tabelle 11 Zeichenerklärung zu Abbildung 2

Kurve	Art der Kontrollen	Bebrütungszeit Stunden	Mediumbehandlung	Alter der Kontrollen	Zahl der Beobachtungen
I x——x	Vollblut (s.Tab.7)	16	nicht autoklaviert	4-11 Monate	20 - 40
II x----x	Serum (s.Tab.8)	15	autoklaviert	2- 4 Wochen	6 - 9
III ▲——▲	Serum (s.Tab.9)	15	autoklaviert	wenige Stunden	4
IV .——.	Serum (s.Tab.10)	18	autoklaviert	wenige Stunden	3

$\bar{x}$ = Mittelwert ± 2x Standardabweichung

Bebrütungszeiten der optimale Meßbereich zwischen 1 bzw. 2 und 4 mg% liegt. Hier sind die Steigungen der Kurven am größten, d.h. eine Differenzierung zwischen den verschiedenen Werten am besten möglich. Befriedigend ist die Trennung der Werte auch noch zwischen 4 und 12 mg%, besonders bei längeren Bebrütungszeiten.

Im Bereich von 12 bis 20 mg% entspricht die Zunahme von 8 mg% Phenylalanin nur einer Zunahme der Wachstumszonendurchmesser von 2-mg%-Stufen im Bereich von 4-12 mg%, d.h. die Empfindlichkeit des Testes ist in diesem Meßbereich nur noch sehr gering. Aus diesem Grund ist es notwendig, für genauere Untersuchungen über 12 mg% die unbekannten Seren soweit zu verdünnen, daß die Phenylanalin-Endkonzentrationen unter 12 mg% fallen. Das Gleiche gilt für die Kontrollseren.

Genauere Bestimmungen im Bereich höherer Phenylalanin-Konzentrationen erschienen nicht von Interesse und wurden daher nicht durchgeführt. Hingegen sind für die Benutzung des Testes zur diätetischen Einstellung von Phenylketonurikern Kontrollwerte unter 2 mg% wichtig. Wie aus den Tabellen 8 und 9 hervorgeht, zeigen 1-mg%-Serumkontrollen noch gut ablesbare Wachstumszonen und weisen eine erhebliche Differenz zum 2-mg%-Wert auf. Auch Phenylalanin-Konzentrationen unter 1 mg% zeigen noch Wachstumszonen, wie die zwei in Tabelle 12 aufgeführten Beobachtungen zeigen:

Tabelle 12

Werte unter 1 mg% mit dem Serumtest

LA DU-Bestimmungen (mg%)	Durchmesser der Wachstumshöfe (mm)	Bebrütungszeiten (Stunden)
0,8	9	14 1/4
0,8	15	18

ß) Vollblutkontrollen

Die Standardisierung der Vollblutkontrollen wird dadurch erschwert, daß fast alle exakteren Phenylalaninbestimmungsmethoden den Gehalt von Phenylalanin im Serum oder Plasma bestimmen. Das gilt auch für die LA DU-Methode. Diese wurde, wie bereits erwähnt, bei Herstellung der Vollblutkontrollen zur Bestimmung der Phenylalanin-Ausgangskonzentration des benutzten Blutes gebraucht (siehe A 2e, Seite 11). Wie SCHEEL und BERRY [54] an mehreren Beispielen belegten, liegen aber Bestimmungen der

Phenylalanin-Konzentration im Serum höher als in der gleichen Volumen-Menge Vollblut. Die genannten Autoren erklären diese Beobachtung mit den unterschiedlich großen Volumina der für Phenylalanin löslichen Fraktionen in Serum und Vollblut. In einem bestimmten Volumen Vollblut kann sich - freie Diffusionsmöglichkeit für Phenylalanin zwischen Blutplasma und Blutzellen vorausgesetzt - das Phenylalanin nur im Wasser des Blut-Plasmas (= 93 % des Plasmas) und im Wasser der Blutzellen (= 65 % der Blutzellen) befinden. In dem gleichen Volumen Serum liegt dagegen das Phenylalanin über die 93 % des Serum-Wassers verteilt vor.

Bei Anwendung dieser Feststellung auf die hergestellten Vollblutkontrollösungen (siehe A 2e: Herstellung der Phenylalanin-Standardwerte, Seite 11) würden sich die nachstehenden Folgerungen ergeben: Werden die Differenzen zwischen den Phenylalanin-Konzentrationen in den Vollblutlösungen und in den entsprechenden Serumlösungen berechnet, so finden sich bei der 2-mg%-Lösung nur ungefähr 0,3 mg% Unterschied, dagegen bei der 20-mg%-Lösung schon knapp 4 mg% mehr Phenylalanin in der Serumlösung. Die berechneten Differenzen sind in Tabelle 13 aufgeführt. Da die Differenzen von dem Hämatokritwert des betreffenden Blutes abhängig sind - je höher der Hämatokritwert, um so höher die Differenz zwischen Vollblut- und Serumbestimmungen - ist bei den hohen Neugeborenen-Hämatokritwerten mit noch größeren Differenzen zu rechnen. Bei Berücksichtigung dieser Schwierigkeiten wäre es eventuell sinnvoll, einen Korrektur-Koeffizienten von Serum auf Vollblut zur Herstellung der Phenylalanin-Vollblutkontrollen einzuführen.

Tabelle 13

Berechnete Differenzen zwischen den Phenylalanin-Konzentrationen in den Vollblutkontrollösungen und in den entsprechenden Serumlösungen

Vollblutkontrollwerte (mg%)	Differenzen zu den entspr. Serumwerten (mg%)
2	0,34
4	0,74
6	1,14
8	1,54
12	2,34
20	3,94

Der günstigste Meßbereich der Vollblutkontrollen ist gut aus Abbildung 2 zu ersehen. Kurve I zeigt die mittleren Durchmesser der Wachstumszonen und die zweifachen Standardabweichungen der Vollblutkontrollen in Abhängigkeit von ihren Phenylalanin-Konzentrationen. Der Verlauf der Kurve I zeigt, daß der beste Meßbereich der Vollblutkontrollen zwischen 2 und 8 mg% liegt. Hier hat die Kurve eine fast durchgehend gleiche Steigung. Oberhalb von 8 mg% verläuft die Kurve flacher, so daß Änderungen der Phenylalanin-Konzentrationen hier nur noch grob angegeben werden können: Die Differenzen der Wachstumszonen zwischen 8 und 12 mg% und zwischen 12 und 20 mg% Phenylalanin liegen nur wenig über den Differenzen für die 2-mg%-Stufen im Bereich der größten Steigung der Kurve.

d) Vergleich der Ergebnisse des GUTHRIE-Testes mit LA DU-Bestimmungen

α) Vergleich von Ergebnissen des GUTHRIE-Vollbluttestes mit denen der LA DU-Methode

37 Blutproben von auf Diät eingestellten Phenylketonurikern wurden parallel mit dem GUTHRIE-Vollbluttest und der enzymatisch-spektrophotometrischen Phenylalanin-Serumbestimmung nach LA DU untersucht. Die Ergebnisse wurden verglichen. (Die LA DU-Bestimmungen wurden von einer technischen Assistentin durchgeführt).

Den Blutproben Nr.1-18 in Tab.14, S.30 lagen Kontrollen zugrunde, die durch mehrwöchige unzureichende Lagerung in einer Tiefkühltruhe (-20° C) ohne Exsikkator deutlich in den Durchmessern der Wachstumszonen abgenommen hatten. Dieser Umstand führte zu höheren Ergebnissen des GUTHRIE-Vollbluttestes, so daß die Vergleiche mit den Serumergebnissen der LA DU-Methode sehr gute Übereinstimmungen brachten.

Die Proben Nr.19-35 wurden mit neu hergestellten Kontrollen verglichen, die dauernd unter optimalen Bedingungen gelagert hatten (im Exsikkator bei 2° C). Diese letztgenannten Kontrollen liegen auch der Abb. 2 und der Tab. 7 zugrunde.

Tab.15 zeigt die Unterschiede der Wachstumszonendurchmesser zwischen den alten und neuen Kontrollen nach 18 1/2-stündiger Bebrütungszeit auf einem autoklavierten Medium.

Die neuen Kontrollen lagen durchschnittlich 2,5 mm über den Durchmessern der Wachstumszonen der alten Kontrollen. Das

Tabelle 14

Vergleich des GUTHRIE-Vollbluttestes mit der LA DU-Methode in den Ergebnissen

Nr. der Blutprobe	Phenylalanin (mg %)	
	Im Vollblut GUTHRIE - Test	Im Serum LA DU - Methode
Verwendung alter Kontrollen (s. Text)		
1	>20	47,18
2	>20	49,42
3	>20	43,11
4	>20	32,75
5	12	11,35
6	8 - 12	11,29
7	8 - 12	8,10
8	8	8,05
9	6 - 8	6,80
10	6 - 8	7,55
11	4 - 6	5,29
12	2	2,12
13	<2	1,00
14	<2	0,80
15	<2	1,65
16	<2	1,04
17	<2	1,25
18	<2	1,50
Verwendung neuer Kontrollen (s. Text)		
19	>20	36,99
20	>20	53,50
21	>20	27,61
22	12 - 20	20,78
23	12 - 20	22,44
24	8	9,08
25	6 - 8	7,8
26	2 - 4	5,46
27	2	3,15
28	<2	1,24
29	<2	1,50
30	<2	2,39
31	<2	2,07
32	<2	1,56
33	<2	2,825
34	<2	1,19
35	<1	0,15

Tabelle 15

Kontrollwerte (mg%)	Durchmesser der Wachstumszonen (mm)	
	alte Kontrollen	neue Kontrollen
2	9	11,5
4	11	13
4	11	13
6	13	15
6	13	14
8	13	16
12	15	18
20	17,5	20

hatte natürlich bei Vergleichen mit LA DU-Bestimmungen niedrigere Ergebnisse des GUTHRIE-Testes zur Folge als mit der ersten Kontrollserie.

Das entspräche der bereits oben angegebenen Differenz zwischen Vollblut- und Serumbestimmungen. Allerdings sind die Differenzen zwischen den LA DU-Bestimmungen und den GUTHRIE-Test-Ergebnissen in einigen Fällen so hoch (Nr.23 und 26 der Tab.14), daß sie nicht nur auf den Unterschied zwischen Vollblut- und Serumbestimmung zurückgeführt werden können. Hier muß man die normale Streubreite eines biologischen Testes, wie sie in Tab. 7 und Abb.2 angegeben ist, mit berücksichtigen.

Wenn man bei Werten, die zwischen zwei Kontrollwerten liegen, die arithmetischen Mittel aus beiden Grenzwerten als Wert der unbekannten Probe annimmt, so findet sich nach Abzug der Differenz zwischen Blut- und Serumbestimmung (s.Tab.13) noch eine maximale Abweichung von der LA DU-Bestimmung von 2,5 mg% (Nr.23 der Tabelle 14).

ß) Vergleich von Ergebnissen des GUTHRIE-Serumtestes mit denen der LA DU-Methode

Es wurden 28 Serumproben von Phenylketonurie-Patienten, die auf phenylalaninarme Diät eingestellt wurden, in ihren Ergebnissen mit parallel durchgeführten LA DU-Bestimmungen verglichen. Die unter 2 a ß) und in Tabelle 6 angegebenen Fehlermöglichkeiten wurden in Tabelle 16 berücksichtigt, d.h. es wurden nur Ergebnisse aufgeführt, die durch Vergleich von nur wenige Stunden gelagerten Kontrollen und zur gleichen Zeit hergestellten unbe-

Tabelle 16

Vergleich des GUTHRIE-Serumtestes mit der LA DU-Methode in den Ergebnissen

Nr. der Serumprobe	Durchmesser der Wachstumszone (mm)	Bebrütungszeit (Stunden)	Phenylalanin im Serum (mg%)	
			GUTHRIE	LA DU
1	26,5	14 1/4	> 20	44,83
2	18,5	14 1/4	8 - 12	11,40
3	18	14 1/4	6 - 8	7,35
4	17	14 1/4	4 - 6	5,8
5	12	14 1/4	1 - 2	1,04
6	12	14 1/4	1 - 2	1,24
7	9	14 1/4	1 - 2	0,106
8	11,5	14 1/4	1 - 2	2,47
9	11,5	14 1/4	1 - 2	1,78
10	9	14 1/4	1 - 2	0,8
11	25	15	> 20	25,23
12	22 Z	15	12 - 20	9,08
13	18	15	4 - 8	9,08
14	14,5	15	2 - 4	1,55
15	14,0	15	2	1,58
16	9	15	1 - 2	1,53
17	9,5	15	1 - 2	1,017
18	15	17	1 - 2	1,69
19	34	18	> 20	32,24
20	34	18	> 20	32,57
21	34	18	> 20	44,03
22	32	18	> 20	44,77
23	27	18	8 - 10	11,29
24	23,5	18	6	7,55
25	23	18	4 - 6	4,46
26	22	18	4	5,29
27	18	18	2	1,65
28	15	18	< 2	0,8

Zeichenerklärung: Z = zusammengewachsene Wachstumszonen

kannten Proben entstanden waren. Zusammengewachsene Wachstumszonen (Z) wurden nur in einem Falle angegeben (Nr.12). Die LA DU-Ergebnisse sind mit wenigen Ausnahmen Mittelwerte aus zwei Bestimmungen.

Wenn wie unter α) bei Werten, die zwischen zwei Kontrollwerten liegen, die arithmetischen Mittel aus beiden Grenzwerten als Wert der unbekannten Probe angenommen werden, so findet sich mit Ausnahme von Nr.12 unter optimalen Bedingungen noch eine maximale Abweichung von $\pm$ 3 mg% des GUTHRIE-Serumtestes gegenüber den LA DU-Bestimmungen. GUTHRIE gab die Genauigkeit der

Bestimmungen seines Testes bei Benutzung von Serum mit ± 2 mg% an [18]. Es fand sich also trotz Messung des Ausgangsvolumens und Wegfall des Autoklavierens der Proben beim Serumtest keine größere Genauigkeit im Vergleich zum Vollbluttest. Stattdessen erwies sich - wie oben schon angeführt - die Haltbarkeit der auf Filterpapierblättchen pipettierten Serumkontrollen als recht gering. Trotz Lagerung im Exsikkator war bei Zimmertemperatur schon nach 14 Tagen ein deutlicher Wachstumsverlust zu bemerken. Auch nach Lagerung bei 2° C im Exsikkator fand sich nach einigen Wochen eine Abnahme der Wachstumszonendurchmesser. Da aber auch die gefroren gelagerten Serumkontrollösungen im Laufe von ca. 7 Wochen in ihrem Phenylalaningehalt leicht abnahmen und außerdem Eiweißausfällungen beim Wiederauftauen zeigten, wurden die Untersuchungen mit dem Serumtest abgebrochen.

e) Einwirkungen von Antibiotika und Sulfonamiden

Eine Empfindlichkeitsprüfung des Bac. subt.-Stammes ergab im Blättchentest die in Tabelle 17 aufgeführten Resultate.

Tabelle 17

Empfindlichkeitsprüfung von Bac. subt. im Blättchentest

Bacillus subtilis - 6051		
empfindlich gegen	schwach empfindlich gegen	resistent gegen
Sulfonamide	Streptomycin	Penicillin
Tetracycline	Kanamycin	Bacitracin
Chloramphenicol	Neomycin	Colistin
Erythromycin	Nitrofurantoin	Cycloserin
Oleandomycin	Novobiocin	Polymyxin B

Bei einem 1 7/12 Jahre alten Kleinkind wurde unter Madribon(R)-Behandlung (14 Tropfen pro die) eindeutige Hemmung des Bac. subt.-Wachstums beobachtet. Dabei sah man noch den äußeren Rand des Wachstumshofes, während unmittelbar um das Testblättchen kein Wachstum sichtbar war. Nach Absetzen der genannten Medikation zeigten sich wieder normale Wachstumshöfe.

Unter Behandlung mit Antibiotika, wie Terramycin, Chloramphenicol, Reverin und Penicillin zeigte sich kein eindeutiger Effekt auf die Ergebnisse des GUTHRIE-Testes.

f) Folgerungen aus den Sensitivitäts-Untersuchungen

Auf Grund der unter a) - d) aufgeführten, teilweise recht erheblichen, Streubreite von Phenylalanin-Bestimmungen mit dem GUTHRIE-Test sind sowohl bei Benutzung des Vollblut-Testes wie auch des Serum-Testes zur Kontrolle der diätetischen Einstellung von Phenylketonurikern Mehrfachbestimmungen der gleichen Blut- oder Serumprobe unerläßlich. Es empfiehlt sich dabei, diese Bestimmungen auf der gleichen und auf verschiedenen Platten parallel auszuführen. GUTHRIE und SUSI [23] pipettieren bei quantitativen Untersuchungen jedes unbekannte Serum auf 6 Filterpapierstückchen (je 0,o1 ml), von denen sie jeweils drei auf die gleiche Platte setzen, die anderen drei auf eine zweite Platte. Das Gleiche müßte für quantitative Untersuchungen mit dem Vollblut-Test gefordert werden. Erst der Mittelwert aus den 6 Ergebnissen, der am besten aus Vergleich des Mittelwertes der 6 Wachstumszonendurchmesser und des Mittelwertes der Kontrolldurchmesser gewonnen wird, bringt auch bei Phenylalanin-Konzentrationen zwischen 8 und 20 mg% ein annähernd sicheres Endresultat. Die Vollblutkontrollen müßten wegen der unter b α) gezeigten Standard-Abweichungen auf jeder Platte ebenfalls in dreifacher Ausführung bestimmt werden.

3. Physiologische und pathologische Befunde bei Neugeborenen-Massentestungen zur Auffindung von Phenylketonurikern

Bis Ende August 1964 wurden Blutproben von insgesamt 7194 Neugeborenen mit dem GUTHRIE-Test untersucht (s.Tabelle 18). Von den 2946 hessischen Blutproben wurden 676 in der Universitäts-Frauenklinik - Marburg bis April 1964, dem Termin der offiziellen Einführung des Testes in Hessen, von mir selbst abgenommen. In Hannover wurden routinemäßige Blutabnahmen für den GUTHRIE-Test bei allen Anstaltsentbindungen im Januar 1964 begonnen, in Bremen im August 1964. Die ersten etwa 1200 Untersuchungen wurden von mir, die späteren Untersuchungen von einer zu diesem Zweck angeleiteten und vom Lande Hessen angestellten technischen Assistentin ausgeführt.

Wie auf Seite 29f. schon erwähnt, benutzte ich bei den Untersuchungen zwei verschiedene Serien von Kontrollen. Mit der ersten nicht optimal gelagerten Kontrollserie wurden 175 Neugeborene, davon 4 Frühgeborene untersucht. Die absolute und prozentuale

Verteilung der Phenylalanin-Blutspiegel dieser Gruppe zeigt **Tabelle 19.**

Tabelle 18

Bis Ende August 1964 getestete Neugeborene

Herkunft der Proben	Zahl der Fälle
Hannover	4205
Hessen	2946
Bremen	43
Gesamt	7194

Tabelle 19

175 mit der ersten Kontrollserie untersuchte Neugeborene

Phenylalanin-Blutspiegel (mg%)	Zahl der Fälle	
	absolut	%
< 2	43	24,6
2	53	30,3
2 - 4	70	40,0
4	6	3,4
4 - 6	3	1,7
6 und > 6	0	0,0
Gesamt	175	100,0

Die vier Frühgeborenen hatten alle einen Phenylalanin-Blutspiegel unter 2 mg%. Alle Neugeborenen waren wenigstens vier Tage alt, als die Blutabnahme vorgenommen wurde. Die meisten Blutproben stammten von sechs Tage alten Kindern.

Mit der zweiten optimal gelagerten Kontrollserie wurden alle übrigen 7019 Neugeborenen-Blutproben untersucht. Diese zweite Hauptuntersuchungsgruppe wurde nach Reifgeborenen und Frühgeborenen unterteilt. Fälle mit starkem Ikterus und mit Asphyxie wurden getrennt aufgeführt. Dabei fanden sich folgende absolute und prozentuale Zahlenverteilungen.

a) Reifgeborene

α) Physiologische Befunde

6601 Reifgeborene wurden untersucht. Davon zeigten 94,5 % keine Besonderheiten, 4,8 % hatten starken Ikterus, 0,6 % hatten Asphyxie und 0,1 % sowohl starken Ikterus als auch Asphyxie. Tab. 20 zeigt die absolute und prozentuale Verteilung.

Tabelle 20

Reifgeborene

Besonderheiten	Zahl der Fälle	
	absolut	%
keine	6240	94,5
stark.Ikterus	316	4,8
Asphyxie	39	0,6
stark.Ikterus und Asphyxie	6	0,1
Gesamt	6601	100,0

Die Phenylalanin-Blutspiegel, die bei den einzelnen Besonderheiten auftraten, zeigt Tabelle 21.

Tabelle 21

Ph.-Blutsp. (mg%)	Zahl der Fälle									
	keine Bes.		st. Ikt.		Asphyxie		st.Ikt.u.Asph.		Summe	
	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%
<2	5511	88,30	272	86,1	39	100	6	100	5828	88,30
2	599	9,62	28	8,9	-	-	-	-	627	9,50
2 - 4	97	1,54	16	5,0	-	-	-	-	113	1,71
4	25	0,41	-	-	-	-	-	-	25	0,38
4 - 6	3	0,05	-	-	-	-	-	-	3	0,04
6 u. >6	5	0,08	-	-	-	-	-	-	5	0,07
Gesamt	6240	100,00	316	100,00	39	100	6	100	6601	100,00

Unter den Fällen ohne Besonderheiten lagen nur 2 % über 2mg%. 98 % zeigten Werte von 2 oder weniger als 2 mg%. Alle Reifgeborenen waren bei Blutabnahme wenigstens vier Tage alt. Die meisten hatten ein Alter von sechs Tagen. Bei starkem Ikterus zeigte sich bei Vergleich mit den Fällen ohne Besonderheiten, prozent-

mäßig gesehen, keine eindeutige Verschiebung zu den höheren Phenylalanin-Konzentrationen.

ß) Pathologische Befunde

Unter den 2 % der Fälle, die über 2 mg% lagen, befanden sich fünf Neugeborene, die Werte von 6 oder mehr als 6 mg% Phenylalanin im Blut aufwiesen, sie mußten nach GUTHRIE als "positiv" angesehen werden.

Von diesen 5 vorläufig positiven Fällen lagen
4 Fälle bei 6 mg% ,
1 Fall bei 12-20 mg% Phenylalanin im Blut.

Endgültig positiv in Wiederholungsversuchen waren drei von diesen Fällen. Sie stammten aus Phenylketonurie-Familien, in denen bereits ein Kind krank war, und erwiesen sich bei klinischer Untersuchung als Phenylketonuriker. Die beiden übrigen Fälle zeigten bei Wiederholungstesten nur noch 4 bis 6 mg%. Trotzdem wurden Wiederholungsblutproben angefordert, die aber bisher nicht eintrafen. Daraus ist ersichtlich, wie sehr ein derartiges Testprogramm von der Mitarbeit aller Zwischenstellen und vor allem auch der Eltern des verdächtigen Neugeborenen abhängt.

Die drei gefundenen phenylketonurischen Neugeborenen zeigten im einzelnen folgende Daten.

Tabelle 22

Phenylalanin-Blutspiegel bei drei mit dem GUTHRIE-Test gefundenen phenylketonurischen Neugeborenen

Name	Geb.Tag	Tag der Probe	Lebens-tag	Phenylalanin-Blutspiegel (mg%)	Entbindungs-anstalt
P.,K.	22.2.64	27.2.64 6.3.64	6.	12 - 20	Warendorf, Josephs-hospital
v.Tr., H.C.	7.7.64	11.7.64 13.7.64 15.7.64	5. 7. 9.	6 12 12 - 20	Univ.Fr.Kl.-Marburg
B.,A.	19.7.64	23.7.64 24.7.64 14.12.64) nach 16.12.64) Eiweiß-belastung	5. 6. 149. 151.	6 6 12 20	Univ.Fr.Kl.-Marburg

b) Frühgeborene

418 Frühgeborene wurden mit der zweiten Vollblut-Kontrollserie untersucht. 78,2 % davon zeigten keine Besonderheiten, 13,3 % hatten einen starken Ikterus, 7 % eine Asphyxie und 1,5 % Ikterus und Asphyxie. Tab. 23 zeigt die absolute und prozentuale Zahlenverteilung.

Tabelle 23

F r ü h g e b o r e n e

Besonderheiten	Z a h l d e r F ä l l e	
	absolut	%
keine	327	78,2
starker Ikterus	56	13,3
Asphyxie	29	7,0
starker Ikterus und Apshyxie	6	1,5
Gesamt	418	100,0

Das Alter der Frühgeborenen lag zwischen 4 Tagen und 8 Wochen mit einem Häufigkeitsmaximum zwischen 14 Tagen und 3 Wochen. Wie zu erwarten, fand sich bei Frühgeborenen im Vergleich mit Reifgeborenen ein größerer Prozentsatz mit starkem Ikterus, Asphyxie oder beiden Besonderheiten.

Tabelle 24

Z a h l d e r F ä l l e

Ph.-Blutsp. (mg%)	keine Bes.		st. Ikt.		Asphyxie		st.Ikt.u.Asph.		Summe	
	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%
< 2	287	87,8	53	94,6	29	100	6	100	375	89,7
2	33	10,1	3	5,4	-	-	-	-	36	8,6
2 - 4	7	2,1	-	-	-	-	-	-	7	1,7
4 u. > 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gesamt	327	100,0	56	100,0	29	100	6	100	418	100,0

Tab. 24 gibt die bei den einzelnen Besonderheiten aufgetretenen Phenylalanin-Blutspiegel wieder. Bei Ikterus und Asphyxie zeigten sich, prozentmäßig gesehen, keine erhöhten Phenylalaninspiegel. Sowohl bei getrennter Betrachtung der Fälle

ohne Besonderheiten und der mit Besonderheiten als auch bei Betrachtung aller Frühgeborenen traten in der prozentualen Verteilung der verschiedenen Phenylalanin-Blutspiegel gegenüber den Reifgeborenen keine deutlichen Unterschiede auf, wobei allerdings das durchschnittlich höhere Lebensalter der Frühgeborenen berücksichtigt werden muß.

c) Summarische Betrachtung der Früh- und Reifgeborenen

Von den mit der zweiten Kontrollserie untersuchten 7019 Neugeborenen waren 94 % Reifgeborene und 6 % Frühgeborene.

Tabelle 25

Art der Geburt	Zahl der Fälle	
	absolut	%
Frühgeburten	418	6
Reifgeburten	6601	94
Gesamt	7019	100

Gemeinsam betrachtet zeigten Früh- und Reifgeborene folgende absolute und prozentuale Phenylalanin-Blutspiegel-Verteilung:

Tabelle 26

Phen. Blutspiegel (mg%)	Frühgeborene und Reifgeborene: Zahl der Fälle	
	absolut	%
< 2	6203	88,40
2	663	9,43
2 - 4	120	1,70
4	25	0,36
4 - 6	3	0,04
6	4	0,06
6 - 8	-	-
8	-	-
8 -12	-	-
12	-	-
12 -20	1	0,01
20	-	-
> 20	-	-
Gesamt	7019	100,00

4. Ergebnisse bei Massentestungen unter Schwachsinnigen

Bis Ende August 1964 wurden 2282 Schwachsinnige mit dem GUTHRIE-Test auf Phenylketonurie untersucht. Tab. 27 zeigt die Anzahl der in verschiedenen hessischen Schwachsinnigen-Anstalten getesteten Fälle und die Zahl der dabei gefundenen Phenylketonuriker.

Tabelle 27

Anstalt	getestet	positiv
Psych.Krhs.-Gießen	146	1
" " -Eichberg	80	-
" " -Kiedrich	65	-
" " -Merxhausen	852	1
" " -Hephata	600	7
Kerstinheim b. Marburg	25	-
Psych.Krhs.-Herborn	156	3
" " -Goddelau	105	3
" " -Treysa	228	-
" " -Heppenheim	25	2
Gesamt	2282	17 = 0,74 %

Es wurden insgesamt 17 positive Fälle gefunden, d.h. unter 2282 Schwachsinnigen 0,74% Phenylketonuriker.

Abb. 3 zeigt neben 103 unauffälligen Wachstumszonen (alle unter 2 mg%) eine, die durch ihre besondere Größe herausragt (4. Reihe von oben, 6. Blutprobe von rechts). Es handelt sich um eine 45jährige Phenylketonurikern aus Merxhausen (s.Tab.28), die unter den nicht phenylketonurischen Blutproben der anderen Schwachsinnigen auf der Platte durch einen Phenylalanin-Spiegel von 12-20 mg% deutlich auffällt.

Eine Übersicht über die Phenylalanin-Blutspiegel und die Altersverteilung der gefundenen positiven Fälle gibt Tab.28.

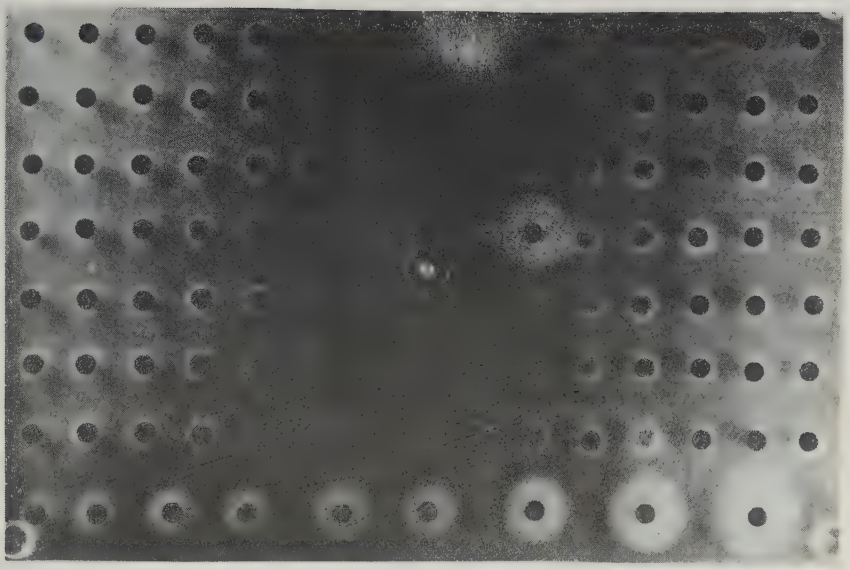

Abb. 3 Auffindung eines positiven Falles unter 104 Schwachsinnigen-Blutproben (Erklärung siehe Text).

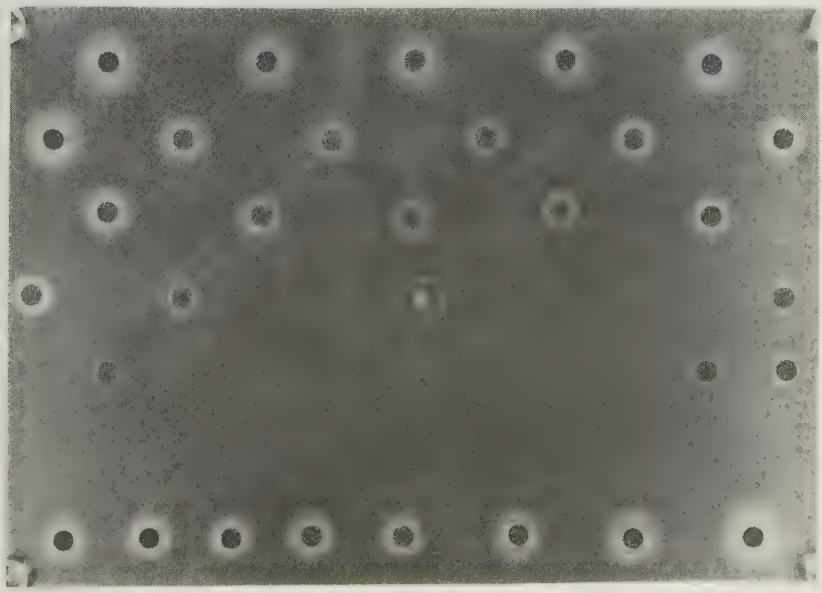

Abb. 4 Verlauf des Phenylalanin-Blutspiegels eines 2 1/2 Monate alten phenylketonurischen Säuglings während einmonatiger diätetischer Einstellung (Erklärung s.Tab. 30 und Text).

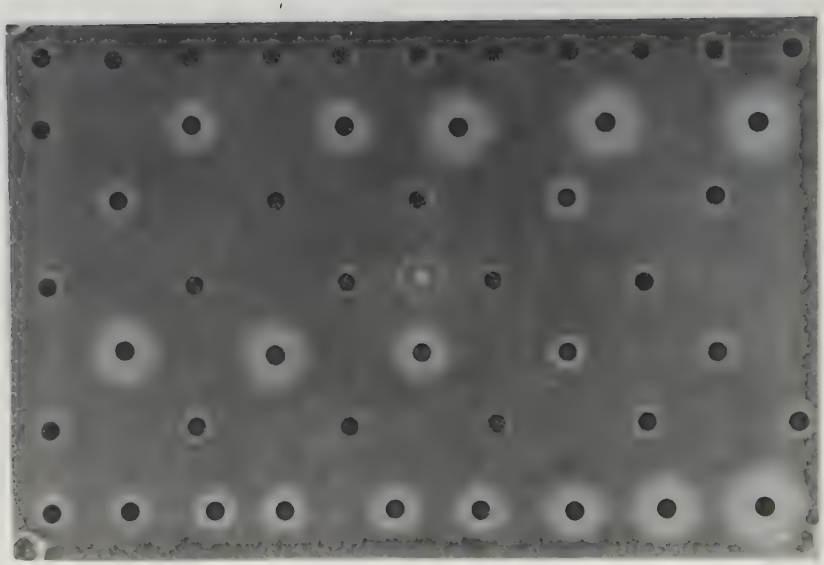

Abb.5 Neben normalen Neugeborenen Verläufe der Phenylalanin-Blutspiegel zweier Phenylketonuriker während der diätetischen Einstellung (Erklärung s.Tab. 31 und Text)

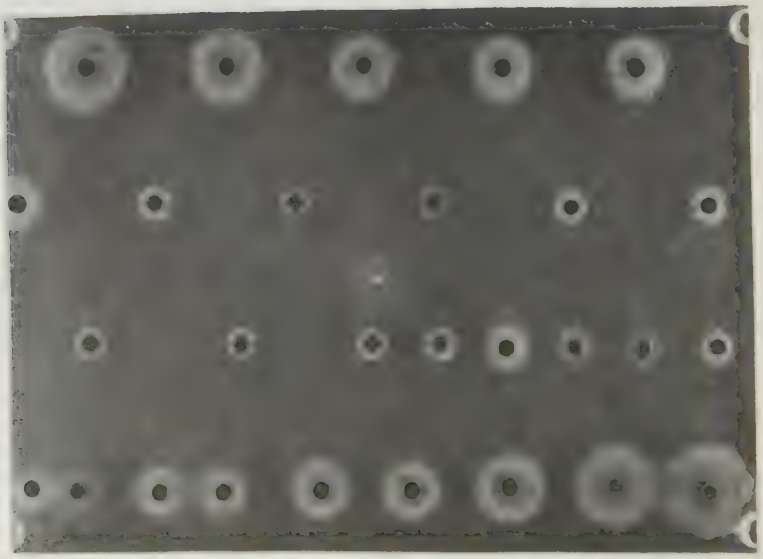

Abb.6 Verlauf des Phenylalanin-Blutspiegels eines phenylketonurischen Neugeborenen unter diätetischer Einstellung (Erklärung s. Tab. 32 und Text).

Tabelle 28

Phenylalanin-Blutspiegel und Altersverteilung bei 17 in Schwachsinnigen-Anstalten gefundenen unbehandelten Phenylketonurikern

Nr.	Anstalt	Patient	Alter (Jahre)	Phenylalanin-Blutspiegel (mg%)
1	Hephata	S., J.	10	> 20
2	"	B., J.	9	12
3	"	K., D.	17	> 20
4	"	T., D.	27	12 - 20
5	"	Schr., H.	7	> 20
6	"	Sp., E.	51	12 - 20
7	"	H., Chr.	20	> 20
8	Psych. Krhs.-Herborn	Pf., M.	9	20
9	"	E., G.	19	12 - 20
10	"	E., J.	21	20
11	Psych. Krhs.-Goddelau	F., G.	32	20
12	"	Gr., E.	25	12 - 20
13	"	E., M.	36	20
14	Psych. Krhs.-Heppenheim	Gn., R.	28	20
15	"	H., P.	59	12
16	Psych. Krhs.-Gießen	M., P.	7	20
17	Psych. Krhs.-Merxhausen	Fr., G.	45	12 - 20

Eine Übersicht über die absolute und prozentuale Verteilung der Phenylalanin-Blutspiegel der getesteten Schwachsinnigen gibt Tabelle 29.

Phenylalanin-Blutspiegel bei Schwachsinnigen

Ph.-Blutspiegel (mg%)	Zahl der Fälle absolut	Zahl der Fälle %
< 2	2227	97,60
2	36	1,57
2 - 4	2	0,09
4	-	-
4 - 6	-	-
6	-	-
6 - 8	-	-
8	-	-
8 - 12	-	--
12	2	0,09
12 - 20	5	0,22
20	6	0,26
> 20	4	0,17
Gesamt	2282	100,00

Auffällig ist beim Vergleich der Phenylalanin-Blutspiegel der nicht phenylketonurischen Schwachsinnigen mit denen der gesunden Neugeborenen (Tab.26), die leichte prozentuale Verschiebung der Phenylalaninspiegel zu höheren Werten bei den Neugeborenen. Die Ursache ist wahrscheinlich in der noch nicht völlig suffizienten Phenylalanin-Transaminase und in dem höheren Eiweißgehalt der Säuglingsnahrung zu suchen.

5. Ergebnisse des Testes bei der diätetischen Einstellung von Phenylketonurikern

GUTHRIE [19, 21] erwähnt, daß die Methode erfolgreich zur Messung des Phenylalanin-Blutspiegels während der Behandlung von Phenylketonurikern mit einer phenylalaninarmen Diät benutzt wurde. Meine diesbezüglichen Erfahrungen stützen sich auf über 30 während der diätetischen Einstellung mit dem Test kontrollierte Phenylketonuriker. Die dabei durchgeführten Parallelbestimmungen mit der LA DU-Methode wurden bereits in den Tabellen 14 und 16, Seite 30 und 32) wiedergegeben.

a) Photographische Dokumentation von vier Verläufen phenylketonurischer Patienten während der diätetischen Einstellung

Zur Dokumentation der mit dem Test bei der diätetischen Einstellung gemachten Erfahrungen dienen die Abbildungen 4 - 6.

Abbildung 4 zeigt den Verlauf des Phenylalanin-Blutspiegels eines phenylketonurischen Säuglings während der Beobachtungszeit von einem Monat. Tabelle 30 gibt die dazugehörigen Daten und die $FeCl_3$-Probe wieder.

Der Test wurde mit einer autoklavierten Mediumlösung durchgeführt. Die Bebrütungszeit betrug 16 Stunden. Am 15.12.63 war der Phenylalanin-Blutspiegel bereits auf einen Wert von 2-4 mg% abgefallen, stieg aber in den nächsten Tagen vorübergehend wieder an, da die phenylalaninarme Diät wegen eines Infektes des Säuglings durch Milchnahrung ersetzt werden mußte. Nach erneuter Behandlung mit phenylalaninarmer Diät fiel der Blutspiegel wieder ab und behielt dann gleichbleibend Werte unter 2 mg%, ja zuweilen auch stark unter 2 mg%. Obwohl der Phenylalanin-Blutspiegel vor der diätetischen Behandlung Werte über 20 mg% zeigte, blieb die $FeCl_3$-Probe bei dem damals 2 1/2 Monate alten Säugling negativ.

Tabelle 30
(vgl.Abb.4)

Verlauf des Phenylalanin-Spiegels des phenylketonurischen Säuglings Al., M., geb.19.9.1963, unter phenylalaninarmer Diät vom 5. 12. 63 - 4. 1. 64

Nr. der Reihe von oben nach unten	Nr.der Blutproben innerhalb d.Reihen v.lks.n.rchts.	Tag der Proben	Durchmesser d.Wachstumszonen (mm)	Phenylal.-Blutspiegel (mg%)	$FeCl_3$-Probe
I	1	5.12.63	21	> 20	Ø
	2	6.	20	> 20	Ø
	3	7.	19	20	Ø
	4	8.	18	12 - 20	Ø
	5	9.	17,5	12 - 20	Ø
II	1	10.	18	12 - 20	Ø
	2	11.	16,5	12	Ø
	3	12.	14,5	8	Ø
	4	13.	14,0	6 - 8	Ø
	5	14.	13,0	4 - 6	Ø
	6	15.	12,0	2 - 4	Ø
III	1	16.	15	8 - 12	Ø
	2	17.	15	8 - 12	Ø
	3	18.	14,5	8	Ø
	4	19.	12	2 - 4	Ø
	5	20.	12	2 - 4	Ø
IV	1	21.	12,5	4	Ø
	2	22.	10	< 2	Ø
	3	23.	9	< 2	Ø
	4	24.	9	< 2	Ø
	5	25.	8	< 2	Ø
	6	26.	8	< 2	Ø
V	1	27.	8,5	< 2	Ø
	2	28.	9,5	< 2	Ø
	3	29.	9	< 2	Ø
	4	31.	8,5	< 2	Ø
	5	2.1.64	8,5	< 2	Ø
	6	4.	9	< 2	Ø
VI Kontrollen	1		11,5	2	
	2		12,5	4	
	3		12	4	
	4		14	6	
	5		13,5	6	
	6		14,5	8	
	7		16,5	12	
	8		19	20	

Zeichenerklärung: Ø = negativ

Abb. 5 zeigt neben einer Reihe normaler Neugeborener (erste Reihe) zwei weitere Verläufe des Phenylalanin-Blutspiegels von Phenylketonurikern unter phenylalaninarmer Diät. Die zweite bis vierte Reihe zeigt die Wachstumszonen eines 6 1/2 Monate alten phenylketonurischen Säuglings, dessen Diät wegen eines Infektes vorübergehend abgesetzt werden mußte. In der fünften und sechsten Reihe finden sich die Wachstumshöfe eines knapp zwei Jahre alten phenylketonurischen Kleinkindes, das von neuem auf phenylalaninarme Diät eingestellt werden mußte. Weitere Einzelheiten vermittelt Tabelle 31.

Bemerkenswert ist ferner, daß die bei dem Säugling Gr.,G. mit Urin vom 27. und 29.1.64 und die bei dem Kleinkind M., G. mit Urin vom 20. und 22.1.64 durchgeführten $FeCl_3$-Proben in keinem Fall ein positives Resultat ergaben (s.Tab.31).

Abb. 6 schließlich zeigt den Verlauf eines mit dem Test gefundenen phenylketonurischen Neugeborenen unter der diätetischen Einstellung. Auch hier wurde das Medium nicht autoklaviert. Die Blutproben wurden anfänglich alle zwei Tage abgenommen (Reihe I und II), später nur noch alle 3 bzw. 4 Tage. Weitere Einzelheiten finden sich in Tab. 32. Die $FeCl_3$-Probe war am 14.Lebenstag des Patienten trotz eines Phenylalanin-Blutspiegels von 20 mg% noch negativ, desgl. an den darauf folgenden Tagen.

Einige zusätzliche Beobachtungen lassen sich aus den wiedergegebenen Testen ablesen.

Die zur Herstellung des in Abb.4 wiedergegebenen Testes benutzte Mediumlösung war nicht autoklaviert. Der Unterschied in den Wachstumszonen bei dem autoklavierten Medium der Abb. 3 und dem nicht autoklavierten Medium der Abb.4 sind deutlich. Bei Benutzung eines nicht autoklavierten Mediums werden die Wachstumszonen größer und sind schärfer begrenzt, so daß eine Differenzierung zwischen den einzelnen Werten besser möglich ist.

Aus Abb. 5 wird auch der in Zusammenhang mit dem Serumtest erwähnte Einfluß einer Nachbarblutprobe mit größerem Phenylalaningehalt auf eine Blutprobe von geringerem Phenylalaningehalt deutlich. Nr.5 der Reihe II und Nr.4 der Reihe III sind leicht miteinander verwachsen. Das hatte zur Folge, daß die Blutprobe Nr.4 in Reihe III einen größeren Wachstumshof zeigte, als ihrem Phenylalaningehalt entsprach. Mit 2-4 mg% liegt sie höher als zwei frühere Bestimmungen, die beide unter 2 mg% lagen.

Tabelle 31
(s. Abb.5)

Die Verläufe der Phenylalanin-Blutspiegel zweier Phenylketonuriker während der diätetischen Einstellung unter einer Reihe normaler Neugeborenen-Blutspiegel

1) Säugling Gr.,G., geb. 7.7.63; 2) Kleinkind M.,G., geb.29.4.62

Art der Blutproben	Nr.der Reihen v.oben n.unten	Nr.d.Blutpr. innerhalb d. Reihen von lks.n.rechts	Tag der Proben	Durchm.d. Wachst.-Zonen (mm)	Phenylalanin-Blutspiegel (mg%)
Normale Neugeborene aus Hannover	I	1		10	< 2
		2		9	« 2
		3		9	« 2
		4		10	< 2
		5		10	
		6		10	
		7		10	
		8		10	
		9		10	
		10		10	
		11		10	
Säugling Gr., G.	II	1	22.1.64	10	< 2
		2	24.	17	6
		3	25.	20	8
		4	26.	25	20
		5	27.	25	20
		6	29.	24	12 - 20
	III	1	31.	13	2 - 4
		2	1.2.64	10	< 2
		3	3.	11	< 2
		4	5.	14	2 - 4
		5	8.	11	< 2
	IV	1	10.	10	< 2
		2	12.	9	« 2
		3	14.	8	« 2
		4	15.	9	« 2
		5	17.	9	« 2
Kleinkind M., G.	V	1	20.1.64	24	12 - 20
		2	22.	24	12 - 20
		3	24.	18	6 - 8
		4	27.	12	< 2
		5	30.	12	< 2
	VI	1	1.2.64	10	< 2
		2	3.	10	< 2
		3	6.	9	« 2
		4	7.	9	« 2
		5	10.	10	< 2
		6	14	11	< 2
Kontrollen	VII	1	12,5	12,5	2
		2		12	2
		3		14,5	4
		4		15	4
		5		17	6
		6		17	6
		7		20	8
		8		22	12
		9		25	20

Tabelle 32
(s. Abb.6)

Verlauf des Phenylalanin-Blutspiegels des phenylketonurischen Neugeborenen P., K., geb.22.4.64 unter phenylalaninarmer Diät vom 6. 3. - 21. 4. 64

Nr.der Reihen v.oben n.unten	Nr.d.Blutpr. innerhalb d. Reihen von lks.n.rechts	Tag der Probe	Durchm.d. Wachst.-Zonen (mm)	Phenylalanin-Blutspiegel (mg%)	$FeCl_3$-Probe
I	1	6.3.64	24	20	∅
	2	8.	21	8 - 12	
	3	10.	19	8	
	4	12.	17	6 - 8	
	5	14.	16	6	
II	1	16.	14	4	
	2	18.	11	<2	
	3	20.	9	<2	
	4	22.	10	<2	
	5	24.	11	<2	
	6	26.	12,5	2	
III	1	28.	10	<2	
	2	1.4.64	9	<2	
	3	3.	10	<2	
	4	7.	10,5	<2	
	5	10.	13	2 - 4	
	6	14.	11	<2	
	7	17.	10	<2	
	8	21.	11	<2	
IV	1		12,5	2	
	2		12,5	2	
	3		14	4	
	4		14	4	
	5		16	6	
	6		16	6	
	7		19	8	
	8		22	12	
	9		24	20	

b) Gegenüberstellung der Phenylalanin-Blutspiegel nach dem GUTHRIE-Test, der Aminosäurenausscheidung nach 2-dimensionaler Papierchromatographie und der $FeCl_3$-Proben

Die Tabellen 33 - 35 geben die Verläufe der Phenylalanin-Blutspiegel, der Aminosäuren-Ausscheidungen und der $FeCl_3$-Proben bei drei Phenylketonurikern ohne Behandlung mit phenylalaninarmer Diät und mit der Diät wieder. (Die Chromatogramme und $FeCl_3$-Proben wurden von einer technischen Assistentin angefertigt). Die Zahlen für die Taurin-Einheiten wurden gewonnen, indem die

Tabelle 33 Säugling B., E., geb. 5. 5. 1963

Datum	Ph.i.Blut GUTHRIE	$FeCl_3$	Cy	Gly	Se	Ta	Th	Al	Gl	Gls	Ass	γ-AB	β-AB	α-AB	Hi	Ly	Ar	Va	Leu	Ph	Ty	Try	Mes	Pr	OPr	Gesamt-T-Werte	Behandlung
								U	r		i		n														
4.3.64	> 20mg%	++	4	30	25		<5	15	15	< 5			< 5		10					30						138	Normalkost
6.3.64	12-20 "	++	8	50	40	<5	5	30	30	< 5					25	<5		<5		35	<5		<5			241	Phenylalaninarme Diät
9.3.64	12 "	∅	4	30	35		<5	20	10				4	< 5	4	8	4	5	10		30 <5		8			181	
11.3.64	6 "	∅	8	>60	50		8	50	20	< 5			15	5		15	4	15	25		35 8		15	+	+	386	
13.3.64	1 -2 "	∅	5	60	50		8	50	40	10			8	5	10	10	4	10	20			15	10	++		345	
16.3.64	2 -4 "	∅	15	>60	60		8	60	60	10			30	5	15	25	8	10	20	8		40	15	+		429	
20.3.64	2 -4 "	∅	8	60	60		10	50	20	8			15	8	8	20	8	8	15			30	8			334	
23.3.64	2 "	∅	15	>60	50		15	50					20	10	15	15	8	15	30		5	40	10			388	
25.3.64	2 -4 "	∅	8	>60	60	<5	15	50	50	5			15	10	20	30	10	8	15			25	15	+		439	
28.3.64	< 2 "	∅	10	60	50		5	50	35	< 5			20	8	8	15	8	8	10		4	20	10			324	
31.3.64	< 2 "	∅	8	50	35	<5	<5	20	25	8			8		10			8	8		4	8	<5			178	
6.4.64	2 "	∅	5	30	15		<5	15	15				4	< 5	10	<5		5	8		<5	10	5			134	
8.4.64	2 "	∅	8	60	35		<5	30	15	8			15	5	15	8	4	8	15		5	20	10			264	
10.4.64	≤ 2 "	∅	8	>60	35		5	40	20	5			25	8	10	8	4	10	20		<5	30	15	+	(+)	356	

Tabelle 34 Säugling Gr., G., geb. 7. 7. 1963

Datum	Ph.i.Blut GUTHRIE	Urin FeCl3	Cy	Gly	Se	Ta	Th	Al	Gl	Gls	Ass	γ-AB	β-AB	α-AB	Hi	Ly	Ar	Na	Le	Ph	Ty	Try	Mes	Pr	OPr	Gesamt-T-Werte	Behandlung
27.1.64	20mg%	ø	5	20	10			10	10	5			< 5		5					8						76	keine Diät
29.1.64	12-20	ø	15	50	40			40	35	5		8		4	5	8	4	4	10	10		15	8			261	Phenylalaninarme Diät
1.2.64	< 2	ø	8	35	35		8	40		8		10		< 5	5	<5	<5	8	15			15	10			206	
10.2.64	< 2	ø	8	30	25		8	20		5			8		5			8	15			15	8			155	
12.2.64	≪2	ø	8	60	25		<5	30	5	8		8		< 5	5	<5		4	8			15	8			223	
17.2.64	≪2	ø	8	>60	40		8	50	10	5		15		8	8	10	5	10	20			25	10			322	
21.2.64	≪2	ø	8	50	30		5	25	10	5		8		< 5	8	8	4	5	10			10	8			197	
26.2.64	< 2	ø	5	30	15		<5	25	8	< 5			8	4	5			4	8			10	8			136	
2.3.64	< 2	ø	4	25	10			10	<5				5	<5				4	4				8	+		84	
6.3.64	< 2	ø	4	25	15		8	10	4	5			8	< 5	5	4	<5	4	10		<5	10	5			126	
9.3.64	≪ 2	ø	15	>60	60		20	50	20	< 5			20	8	15	30	10	20	30			40	10	++		471	
10.3.64	≪ 2	ø	5	50	30		5	30	8	5			10	8		5	4	8	15			25	5			213	
12.3.64	≪ 2	ø	8	>60	50		8	40	10	8			10	8	5	15	8	8	15			30	8			321	
13.3.64	< 1	ø	4	35	15			30	10	< 5			10	15	+	8	4	8	10			20	5	(+)		197	

Tabelle 35 Kleinkind M., G., geb. 29. 4. 1962

Datum	Ph.i.Blut GUTHRIE	U r i n																								Gesamt-T-Werte	Be-Handlung
		$FeCl_3$	Cy	Gly	Se	Ta	Th	Al	Gl	Gls	Ass	γ-AB	ß-AB	α-AB	Hi	Ly	Ar	Va	Le	Ph	Ty	Try	Mes	Pr	OPr		
20.1.64	12-20mg%	ø	8	5	4			4	4	< 5			< 5							8						39	keine
22.1.64	12-20mg%	ø	8	4	<5			<5	<5	< 5			< 5							10						37	Diät
27.1.64	< 2 "	ø	10	15	35			15	5	8	< 5	15		< 5	4	8	5	8	15			25	10			184	phenylalanin-arme Diät
3.2.64	< 2 "	ø	8	8	15			15	5	8		8		5		10	5	5	15			15	5			127	
10.2.64	< 2 "	ø	8	5	15		<5	10	<5	8			8	4				4	5			15	4			92	
24.2.64	«2 "	ø	15	10	25		<5	15	15	8			5	8		8		8	15			15	10			160	
26.2.64	«2 "	ø	15	20	35			30	15	10			8	5	5	10		5	15			10	10			193	
3.3.64	«2 "	ø	8	25	35		<5	25	10	15			20	5	10	10	4	10	20			30	10			240	

Aminosäuren - Abkürzungen der Tabellen 33 - 35

Cy = Cysteinsäure
Gly = Glykokoll
Se = Serin
Ta = Taurin
Th = Threonin
Al = Alanin
Gl = Glutamin
Gls = Glutaminsäure

Ass = Asparaginsäure
γ-AB = γ-Aminobuttersäure
ß-AB = ß-Aminobuttersäure
α-AB = α-Aminobuttersäure
Hi = Histidin
Ly = Lysin
Ar = Arginin
Va = Valin

Le = Leuzin + Isoleuzin
Ph = Phenylalanin
Ty = Tyrosin
Try = Tryptophan
Mes = Methioninsulfon
Pr = Prolin
OPr = Oxyprolin
T-Werte = Taurin-Werte

Ninhydrinflecken für die Aminosäuren mit auf dem gleichen Chromatogramm befindlichen Testflecken von 5,10,20,40 und 60 γ Taurin nach Farbintensität und Größe verglichen werden.
Es zeigten sich dabei folgende Gesetzmäßigkeiten:

(I) Bei hohen Phenylalanin-Blutspiegeln ohne diätetische Behandlung mit phenylalaninarmem Kaseinhydrolysat besteht eine vermehrte Phenylalaninurie, die anderen Aminosäuren werden jedoch in physiologischen Werten ausgeschieden.

(II) Unter phenylalaninarmer Diät sinkt der Phenylalanin-Blutspiegel und die Phenylalanin-Urinausscheidung auf Normalwerte ab, während gleichzeitig die Ausscheidung der übrigen Aminosäuren über die Norm ansteigt.

(III) Generalisierte erhöhte Aminoazidurie tritt unter der Diät auf: (1) geringfügig, bei erhöhten oder bei normalisierten Phenylalanin-Blutspiegeln, vermutlich durch Ausscheidung der dem Darm mit dem Hydrolysat in unphysiologischer Form angebotenen Aminosäuren, (2) massiv, mit anfangs erniedrigtem, später ansteigendem Phenylalanin-Blutspiegel durch Abbau von Körpereiweiß bei zu scharfer Einstellung, d.h. zu starkem Phenylalanin-entzug in der Diät.

(IV) Sobald Kaseinhydrolysat gegeben wird, sind Phenylalanin und Tryptophan im Chromatogramm überlagert. Es kann dann mit der angewandten chromatographischen Methode nicht entschieden werden, bei welchen Phenylalanin-Blutwerten Phenylalanin im Urin auftritt.

(V) Bei Phenylalanin-Blutspiegeln über 15 mg% tritt nicht in allen Fällen eine positive $FeCl_3$-Probe auf.

D R I T T E R T E I L

D I S K U S S I O N

Die Aussage GUTHRIE's, daß der Test eine annähernd genaue Messung des Phenylalanin-Blutspiegels gestatte und sensitiv genug sei, um als Routinetest bei allen Neugeborenen zur Auffindung neuer Phenylketonuriker zu dienen, wurde von SCHEEL und BERRY [54] aus technischen Gründen scharf kritisiert.

Bei Parallelbestimmungen mit dem GUTHRIE-Test, der LA DU-Methode und der papierchromatographischen Methode nach BERRY oder einer Modifikation der letzteren [15] fanden die Autoren eine größere Zahl zu hoher Phenylalanin-Konzentrationen mit dem GUTHRIE-Test. Bei Proben von behandelten Phenylketonurie-Patienten, deren Serum-Phenylalanin-Spiegel mit den anderen Methoden zwischen 2 und 11 mg% lagen, ergaben sich mit dem GUTHRIE-Test Werte zwischen 8 und 20 mg%.

Im Gegensatz zu SCHEEL und BERRY beobachtete ich bei Vergleichen von Ergebnissen des GUTHRIE-Testes mit denen der LA DU-Methode nur eine maximale Abweichung von $\pm$ 2,5 mg%. Dabei waren die Abweichungen im Bereich niedriger Phenylalanin-Konzentrationen, d.h. zwischen 2 und 8 mg% am geringsten. Hier lag auch die größte Sensitivität und der beste Meßbereich des Testes. PARTINGTON und SINNOT [53] konnten gleichfalls eine größere Genauigkeit und Sensitivität des Testes unter 10 mg% feststellen.

Weiter beobachteten SCHEEL und BERRY [54] bei einer Gruppe von 95 Reifgeborenen, die am Tage der Entlassung aus der Entbindungsanstalt getestet wurden, gleichfalls zu hohe Phenylalanin-Konzentrationen mit dem GUTHRIE-Test, bei Vergleich mit den anderen Methoden. Von den 95 Neugeborenen hatten 93 (98 %) einen Serum-Phenylalanin-Spiegel unter 4 mg%, sowohl mit der LA DU-Methode als auch mit der papierchromatographischen Methode. Dagegen fanden sie mit dem GUTHRIE-Test bei den gleichen Neugeborenen in 5 Fällen (5,3 %) Werte von 12 mg% oder darüber; in weiteren 15 Fällen (21 %) fanden sie Wachstumszonen von 8 mg% oder zwischen 8 und 12 mg%.

Meine Beobachtungen stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen von SCHEEL und BERRY. Unter 7194 Neugeborenen beobachtete ich bei Zugrundelegung eines Blutspiegels von 6 mg% als verdächtigen Grenzwert nur 2 "falsch" positive Werte, d.h. Werte, die bei Kontrolluntersuchungen keinen weiteren Anstieg wie bei PKU, sondern einen Abfall auf Normalwerte zeigten. Auch PARTINGTON und SINNOTT [53] beobachteten unter 2400 getesteten Neugeborenen nur 1 "falsch-positiven" Fall. Bei weiteren 1734 Blutproben anderen Ursprungs fanden sie keinen "falsch-positiven" Fall. MC CREADY [45] berichtete von 50 000 getesteten Neugeborenen, unter denen auf etwa 700 Fälle 1 Grenzfall mit Phenylalanin-Blutspiegeln zwischen 6 und 12 mg% kam; Wiederholungsteste zeigten dann normale Resultate.

Ein kürzlicher Bericht GUTHRIE's über das Phenylketonurie-Test-Programm in den USA [20] - darin sind auch die von MC CREADY untersuchten Fälle enthalten - zeigte, daß sich unter den ersten 238 161 mit dem GUTHRIE-Test untersuchten Neugeborenen 186 "vorläufig positive" Fälle befanden (bei 6 mg% als verdächtigem Grenzwert). Davon wurden 22 Neugeborene als wirkliche Phenylketonuriker bestätigt. Das gibt eine Häufigkeit von einem "falsch-positiven" Fall unter 1450 Blutproben. Eine annähernd ähnliche Häufigkeit von "falsch positiven" Fällen (1 auf 1650) fanden BRANDON und ASHLEY [13] bei 11 556 GUTHRIE-Testen.

Es wurde vermutet [13,45,21], daß die abnormen Ergebnisse von SCHEEL und BERRY auf den Gebrauch von WHATMAN- statt Schleicher- u.Schüll-Filterpapier zurückzuführen sind. PARTINGTON und SINNOTT [53] sahen jedoch nach eingehenden Vergleichen beider Filterpapiersorten hierin keine hinreichende Erklärung für die abweichenden Ergebnisse. Nach meiner Erfahrung mit der Lagerung der Kontrollen müßte auch an eine insuffiziente Lagerung als Ursache der abweichenden Ergebnisse gedacht werden.

Weitere Möglichkeiten für "falsch" positive Resultate ergeben sich aus den Beobachtungen von LA DU et al. [32] und von HSIA et al. [33]. Beide Arbeitsgruppen beobachteten-LA DU mit der LA DU-Methode, HSIA mit der fluorimetrischen Methode nach MC CAMAN und ROBINS - vorübergehend mäßig erhöhte Serum-Phenylalanin-Spiegel bei Frühgeborenen. Untersuchungen von LA DU und Mitarbeitern ergaben bei einem Viertel von 30 Frühgeborenen im Alter zwischen 2 und 72 Tagen Werte zwischen 3,5 und 6 mg%.

HSIA und Mitarbeiter fanden während der ersten Lebenswoche bei 18 Frühgeborenen im Vergleich mit 100 älteren Kontrollfällen keine signifikanten Unterschiede. Dagegen zeigte sich in der zweiten und dritten Woche ein signifikant höherer Serum-Phenylalanin-Spiegel von 6,23 ± 1,95 mg% gegenüber den Kontrollen. In der vierten Woche begann der Spiegel wieder abzufallen.

In meinen Untersuchungen mit dem GUTHRIE-Vollbluttest hatten von 418 Frühgeborenen (Tab.24) im Alter von 4 Tagen bis 8 Wochen nur 7 Fälle (1,7 %) Werte zwischen 2 - 4 mg%. Kein Fall lag über 4 mg%. Altersmäßig lagen die Frühgeborenen mit den höheren Blutspiegeln am Beginn der zweiten Lebenswoche. Aus diesen Beobachtungen war keine Erhöhung des Phenylalanin-Spiegels bei Frühgeborenen ersichtlich.

Untersuchungen an 100 Reifgeborenen während der ersten sieben Lebenstage durch HSIA und Mitarbeiter ergaben keinen Fall, der einen Serum-Phenylalanin-Spiegel von 4 mg% und höher zeigte. Indessen fanden LA DU und Mitarbeiter in einer Gruppe von 30 zwei bis zehn Tage alten Reifgeborenen 6 mit Werten über 3 mg%, der höchste Wert lag bei 7,4 mg%. Bei 19 ein bis zwei Tage alten Reifgeborenen lagen die Serum-Phenylalanin-Spiegel dagegen noch alle unter 3 mg%, die meisten unter 2 mg%. Die Anamnese der Reifgeborenen mit abnorm erhöhten Phenylalanin-Spiegeln ergab in einigen Fällen einen pathologisch gesteigerten Ikterus neonatorum simplex, jedoch nie Anhalt für eine Blutinkompatibilität.

Um dieser Frage noch einmal nachzugehen, wurden in meinen Beobachtungen Reifgeborene mit starkem Ikterus getrennt aufgeführt (s.Tab.21). Unter den 6240 Reifgeborenen ohne klinische Besonderheiten zeigten, abgesehen von den 3 definitiv positiven Phenylketonurie-Fällen, 30 Fälle (0,5 %) Werte von 4 und mehr als 4 mg% Phenylalanin im Blut. In der Gruppe von 316 Reifgeborenen mit starkem Ikterus (s.Tab.21) zeigte dagegen kein Fall 4 mg% oder höhere Werte, lediglich 16 Fälle (5 %) lagen zwischen 2 und 4 mg%. Es ließ sich also bei Fällen mit starkem Ikterus keine eindeutige Verschiebung zu höheren Phenylalanin-Konzentrationen feststellen. Daß bei hohen Bilirubinspiegeln nicht unbedingt eine Erhöhung des Phenylalanin-Spiegels auftreten muß, beobachteten auch LA DU und Mitarbeiter [32] bei Untersuchungen einiger Kinder mit indirekten Bilirubinspiegeln von über 20 mg%, deren Serum-Phenylalanin-Spiegel im Bereich der Norm lagen.

Die Ursachen für über der Norm liegende Phenylalanin-Spiegel im Neugeborenenalter sind also wohl weniger in einem starken Ikterus als in einer Reifungsverzögerung der Phenylalaninhydroxylase zu suchen.

Wie die Untersuchungen an 10 Blutprobenpaaren (s.Seite 14) zeigten, können "falsch positive" Ergebnisse in seltenen Fällen auch durch zu große Blutflecke auf dem Filterpapier zustandekommen. Vor allem mehrmaliges Applizieren von Blutstropfen auf die gleiche Stelle, nachdem die vorherige Applikation bereits angetrocknet war, bewirkte leichte Vergrößerung der Wachstumszonen. Auch PARTINGTON und SINNOTT [53] fanden bei 20 Blutprobenpaaren der gleichen Versuchsperson - 20 Blutflecke hatten die vorschriftsmäßige Größe zwischen 3/8 und 1/2 inch, die anderen 20 hatten Durchmesser über 3 inches - etwas größere Wachstumszonen bei den größeren Blutflecken. Die Unterschiede waren jedoch gering. 7 Paare zeigten die gleichen Durchmesser, bei 12 Paaren fanden sie 1 mm größere und bei 1 Paar 2 mm größere Wachstumszonendurchmesser.

Die Frage, ob der Test auch "falsch" negative Ergebnisse bringt, läßt sich nicht mit Sicherheit beantworten. Nach den Beobachtungen von PARTINGTON und SINNOTT mit 888 zu kleinen Blutproben [53] scheint bei phenylketonurischen Neugeborenen, deren Blutspiegel gerade an der Grenze des pathologischen Wertes (6 mg%) liegen, bei Verwendung zu kleiner Blutproben durchaus einmal ein negatives Resultat vorzukommen. Es ist daher empfehlenswert, nur ausreichend große Blutflecke von mindestens 8 mm im Durchmesser zu verwenden.

Ob Antibiotika und Sulfonamide, gegen die der benutzte Bac. subt.-Stamm nicht resistent ist, einen reduzierenden Einfluß auf die Größe der Wachstumszonen haben, ließ sich gleichfalls nicht sicher klären. Zumindest ist an diese Möglichkeit als Ursache "falsch negativer" Ergebnisse bei Individuen, die unter Antibiotika- oder Sulfonamidbehandlung stehen, zu denken. PARTINGTON und SINNOTT [53] fanden bei 6 Neugeborenenblutproben überhaupt kein Wachstum um die Testblättchen. Zwei dieser Fälle waren mit Antibiotika behandelt worden. Die Autoren vermuteten daher einen entsprechenden Zusammenhang als Ursache. Ob die Vermutung richtig war, läßt sich nicht entscheiden, da die Autoren keine Resistenzbestimmung ihres Bac.subt.-Stammes durchführten.

Für die Ursache des Phänomens in den anderen 4 Fällen fanden sie keine befriedigende Erklärung. Für eine Interferenz des Testes durch eine antibakterielle Therapie werteten sie die Beobachtung eines älteren Kindes, das wegen einer eitrigen Meningitis massiv mit intravenösen Gaben von Tetracyclinen, Penicillin und Sulfonamiden behandelt worden war und einen wachstumsfreien Hof um das Testblättchen von 30 mm Durchmesser zeigte. Dagegen fanden sie bei zahlreichen anderen Neugeborenen und älteren Individuen, die zur Zeit der Blutabnahme unter antibiotischer Behandlung standen, normale Wachstumszonen mit dem GUTHRIE-Test.

Auch ich beobachtete wiederholt überhaupt kein Wachstum um die Testblättchen. In zwei Fällen handelte es sich um Neugeborene, die mit Penicillin behandelt waren. Jedoch konnte darin nicht die Ursache des fehlenden Wachstums liegen, da der benutzte Bac. subt.-Stamm eine Resistenz gegen Penicillin aufwies. Auch zeigten alle anderen mit Penicillin behandelten Patienten normalgroße Wachstumszonen. Einige Fälle ohne Wachstumszone ließen sich durch Naßwerden der Blutproben beim Autoklavieren erklären, andere waren versehentlich zweimal autoklaviert worden. Der Rest, darunter auch die beiden mit Penicillin behandelten Fälle, blieb ungeklärt. Nur unter Madribon®-Therapie konnte ich bei einem 1 7/12 Jahre alten Kleinkind eine eindeutige Hemmung des Bac. subt.-Wachstums feststellen. Während Behandlung mit Terramycin, Chloramphenicol und Reverin zeigte sich kein eindeutiger Effekt auf die Ergebnisse des GUTHRIE-Testes.

Diese begrenzten Erfahrungen mit Blutproben von Fällen die mit Antibiotika und Sulfonamiden behandelt wurden, lassen offensichtlich eine endgültige Aussage über wachstumshemmende Einflüsse auf den Test noch nicht zu. Immerhin ist auf Grund des von PARTINGTON und SINNOTT beschriebenen und des von mir unter Madribon®-Behandlung beobachteten Falles zumindest bei Sulfonamid- und sehr massiver Antibiotika-Therapie mit einem wachstumshemmenden Einfluß zu rechnen.

Schließlich muß noch erwähnt werden, daß Blutproben, die zu kurze Zeit nach der Geburt abgenommen wurden, auch zu "falsch" negativen Resultaten führen können. Die Ursache hierfür liegt in den von ARMSTRONG und Mitarbeitern [5] gemachten Beobachtungen, daß phenylketonurische Neugeborene bei der Geburt

noch normale Phenylalanin-Blutspiegel aufweisen und erst im Laufe der nächsten Lebenstage nach Proteinzufuhr mit der Säuglingsnahrung die Blutspiegel ansteigen. Nur die sehr seltenen Fälle, bei denen bereits bei der Mutter die unbehandelte Erkrankung vorliegt, machen hierin eine Ausnahme, d.h. weisen auch bei Geburt schon stark erhöhte Phenylalanin-Spiegel auf [57]. Die von ARMSTRONG et al. [5] beobachteten 6 neugeborenen Phenylketonuriker hatten am vierten Lebenstag bereits alle Phenylalanin-Serumspiegel über 6 mg% und wären daher zu dieser Zeit bei einer Neugeborenen-Routinetestung erfaßt worden.

Zwei von HSIA et al. beobachtete [33] phenylketonurische Neugeborene hatten am dritten Lebenstag schon Phenylalanin-Serumspiegel über 6 mg%. Das eine Kind wies am Tage der Geburt bereits einen Serumspiegel von 6,8 mg% auf, der bis zum 6. Lebenstag auf 38 mg% anstieg. Das andere Kind zeigte am 3.Lebenstag einen Spiegel von 9,9 mg% Phenylalanin im Serum und am 6.Lebenstag 41,3 mg%. Auch diese Kinder wären einer Routinetestung mit dem GUTHRIE-Test nicht entgangen. GUTHRIE und Mitarbeiter [21] fanden bei zwei phenylketonurischen Neugeborenen am zweiten Lebenstag bereits Phenylalanin-Blutspiegel über 6 mg%. Über ähnliche Ergebnisse berichtete JERVIS [36] am zweiten Lebenstag bei drei weiteren Fällen. Die drei von mir (Tab.22) wiedergegebenen phenylketonurischen Neugeborenen wiesen in der ersten Lebenswoche in jedem Falle mindestens einen Wert von 6 mg% auf. Ein Kind zeigte am sechsten Lebenstag einen Blutspiegel von 12 - 20 mg% Phenylalanin, bei den anderen beiden Fällen fanden sich jeweils am fünften Lebenstag nur 6 mg%.

Obwohl die Zahl der Beobachtungen über die Phenylalanin-Blutspiegel phenylketonurischer Neugeborener noch klein ist und noch viele Unklarheiten bestehen, scheinen doch die Blutspiegel in den meisten Fällen schon in den ersten 2 - 3 Lebenstagen hoch genug zu liegen, um bei einer Routine-Testung entdeckt zu werden. Auf Grund der beiden Beobachtungen von nur 6 mg% am fünften Lebenstag scheint aber aus Sicherheitsgründen eine Herabsetzung des pathologischen Grenzwertes von 6 auf 4 mg% empfehlenswert. Vor allem bei Blutproben, die vor dem 5. Lebenstag abgenommen sind, ist diese Vorverlegung des Grenzwertes unvermeidlich, auch auf das Risiko eines größeren Prozentsatzes "falsch positiver" Ergebnisse hin.

Da in den USA die Neugeborenen im allgemeinen früher als bei uns entlassen werden, in manchen Fällen sogar schon nach dem ersten oder zweiten Lebenstag, hat man dort inzwischen den pathologischen Grenzwert auf 4 mg% herabgesetzt [24] .

Wahrscheinlich ist es trotzdem nicht möglich, bei derartig frühen Entlassungsterminen alle positiven Fälle mit dem Test zu entdecken. Von GUTHRIE wird daher die Forderung erhoben, eine zweite Kontrolluntersuchung routinemäßig einige Wochen nach der Geburt anzuschließen.

Schwerwiegende Argumente gegen eine Benutzung des Testes zur Routineuntersuchung aller Neugeborenen fanden sich nicht. Der Test ist einfach und rasch in der Handhabung, spezifisch, zuverlässig und vergleichsweise billig. Da er außerdem noch in der Lage ist, phenylketonurische Fälle zu einem Zeitpunkt zu entdecken, zu dem die Behandlung die größten Erfolgsaussichten hat, erscheint er für Routinetestungen Neugeborener als durchaus geeignet. Für die endgültige Sicherung der Diagnose sind jedoch Phenylalanin-Bestimmungen im Blut mit einer unabhängigen quantitativen Methode sowie Urinuntersuchungen auf Phenylbrenztraubensäure oder O-HO-Phenylessigsäure anzuraten.

Eine Benutzung des Testes zur diätetischen Einstellung von Phenylketonurie-Patienten ist wegen seiner relativ großen Streubreite nur bei Mehrfachbestimmungen der Blut- oder Serumproben auf der gleichen und auf verschiedenen Testplatten empfehlenswert.

Für die Erkennung von deutlich erniedrigten Phenylalaninwerten im Blut unter 1 mg% ist der GUTHRIE-Test nicht geeignet. Dabei findet sich eine generalisierte Aminoazidurie, die papier- oder säulenchromatographisch nachgewiesen werden kann und bereits von LINNEWEH und EHRLICH [42] beschrieben wurde.

B HINWEIS AUF DREI WEITERE STOFFWECHSELKRANKHEITS-TESTE

Abschließend sei darauf hingewiesen, daß in jüngster Zeit von GUTHRIE und Mitarbeitern ähnliche Teste zur Frühdiagnose von drei weiteren Stoffwechselkrankheiten, der Ahorn-Sirup-Krankheit, der Galaktosämie und der Histidinämie entwickelt wurden [27; 28; 29] .

1. Ahorn-Sirup-Test

In dem Test auf Ahorn-Sirup-Krankheit wird die erhöhte Blutkonzentration der Aminosäure Leuzin nachgewiesen. Der einzige Unterschied zum Phenylketonurie-Test liegt in der Benutzung eines anderen Hemmstoffes, nämlich 2-Methylleuzin. Medium, Inoculum etc. sind gleich.

2. Histidinämie-Test

Der Histidinämie-Test unterscheidet sich ebenfalls nur durch den Hemmstoff von dem Phenylketonurie-Test. Hier wird die Auskeimung von Bac. subt.-Sporen durch den Histidin-Antagonisten Azoserin gehemmt.

3. Galaktosämie-Test

Dieser Test beruht auf einem anderen Prinzip. Hier sind Hemmstoff und Testsubstanz identisch, nämlich Galaktose selbst. Durch Benutzung einer galaktose-sensitiven Escherichia coli-Mutante als Inoculum entsteht um galaktose-haltige Filterpapierblättchen ein Hemmhof und nicht wie bei den anderen Testen ein Wachstumshof.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Der GUTHRIE-Test zur Bestimmung der Phenylalanin-Konzentration im Blut wird auf seine Brauchbarkeit zur Frühdiagnose der Phenylketonurie kritisch untersucht. Die Erfahrungen mit über 9 000 GUTHRIE-Testen werden wiedergegeben. Kleine technische Modifikationen, wie Reduktion der Agar-Agar-Konzentration, nicht autoklaviertes Medium, bei Behandlung der Blutproben höherer Autoklavierdruck und gesättigter Dampf, werden vorgenommen.

Methodische Untersuchungen an Agar-Agar und Filterpapier, über die Größe der Blutflecken, über Lagerung der Kontrollen, Zusammensetzung des Mediums und über die Frage einer Ersetzbarkeit des Autoklavierens der Blutproben durch Heißluftsterilisation werden durchgeführt.

Eine Spezifitätsuntersuchung ergibt, daß die durch ß-2-Thienylalanin herbeigeführte Hemmung der Auskeimung der Bac. subt.-Sporen von keiner anderen physiologischen Aminosäure, inklusive Prolin, und auch nicht von den beiden Phenylalanin-Verwandten Adrenalin und Thyroxin aufgehoben wird.

Die Sensitivität des Testes wird für Vollblut- und Serumproben an der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, an der Streuung der Kontrollen, an dem Meßbereich der Kontrollen und an Vergleichen der Ergebnisse mit LA DU-Bestimmungen untersucht. Der günstigste Meßbereich für Vollblutproben liegt zwischen einem Phenylalaningehalt von 2 - 8 mg%, für Serumproben zwischen 1 und 4 mg%. Eine in diesem Zusammenhang durchgeführte Untersuchung der Einwirkung von Antibiotika und Sulfonamiden zeigt unter Madribon(R) Therapie eindeutige Hemmung des Bac.subt.-Wachstums. Antibiotika-Behandlung läßt keine endgültigen Schlußfolgerungen auf eine konstante Hemmwirkung zu.

Physiologische und pathologische Befunde bei 7194 getesteten Neugeborenen werden wiedergegeben. Eine Aufteilung der Fälle nach Frühgeborenen und Reifgeborenen und eine weitere Untergliederung in Fälle mit starkem Ikterus, Asphyxie und solchen, die an beiden Komplikationen litten, ergibt keine eindeutige Verschiebung der Phenylalanin-Blutspiegel in Bereiche über 2 mg% bei stark ikterischen Reifgeborenen. Drei phenylketonuri-

sche Neugeborene aus bekannten Phenylketonurie-Familien wurden am 5. bzw. 6. Lebenstag entdeckt.

Unter 2282 getesteten Schwachsinnigen wurden 17 Phenylketonuriker gefunden. Die Phenylalanin-Blutspiegel der nicht phenylketonurischen Schwachsinnigen zeigen einen höheren Prozentsatz an Werten unter 2 mg% als die Neugeborenen (Differenz fast 10 %).

Die Ergebnisse des Testes bei der diätetischen Einstellung werden durch vier Phenylalanin-Blutspiegel-Verläufe von Phenylketonurie-Patienten unter der Diät photographisch dokumentiert. Bei synoptischer Betrachtung der Phenylalanin-Blutspiegel, der Aminosäuren-Ausscheidung und der Ferrichlorid-Proben findet sich neben einem zuweilen auch noch bei Phenylalanin-Blutspiegeln zwischen 12 und 20 und von genau 20 mg% negativem $FeCl_3$-Test vor allem eine deutlich erhöhte generalisierte Aminoaziduurie unter phenylalaninarmer Diät. Unter Normalkost wird bei stark erhöhten Phenylalanin-Blutspiegeln und vermehrter Phenylalaninurie eine Ausscheidung der übrigen Aminosäuren in physiologischen Werten beobachtet. Da sich unter der Diät Phenylalanin und Tryptophan im Urin-Chromatogramm überlagerten, läßt sich keine Aussage machen, bei welchen Phenylalanin-Blutwerten Phenylalanin im Urin auftritt.

Die Diskussion behandelte besonders die Abgrenzung "falsch" positiver und die Möglichkeit "falsch" negativer Ergebnisse. Zusammenfassend kann ausgesagt werden, daß der Test genügend einfach, rasch, spezifisch, preiswert und zuverlässig ist, um seine Anwendung für die Routinetestung aller Neugeborenen zu rechtfertigen. Bei Benutzung zur Kontrolle der diätetischen Einstellung erwies er sich nur bei Beachtung spezieller Untersuchungsbedingungen als brauchbar.

Abschließend wurde noch auf drei weitere Teste hingewiesen, die dem Nachweis der Ahorn-Sirup-Krankheit, der Histidinämie und der Galaktosämie dienen.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Armstrong,M.D., and Tyler,F.H.: Studies on Phenylketonuria. I. Restricted phenylalanine intake in phenylketonuria. J.cln. Invest. 34, 565 (1955).

2. Armstrong,M.D., and Binkley Jr.,E.L.: Studies on phenylketonuria. V. Observations on a newborn infant with phenylketonuria. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 93, 419 (1956).

3. Armstrong,M.D., Low,N.L., and Bosma,J.F.: Studies on Phenylketonuria. IX. Further observation on the effect of phenylalanine restricted diet on patients with phenylketonuria. Amer. J.Clin.Nutr.5, 543 (1957).

4. Armstrong,M.D., and Low,N.L.: Phenylketonuria VIII.Relation between age, serum phenylalanine level, and phenylpyruvic acid excretion. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 94,142-146 (1957).

5. Armstrong,M.D., et al.: The development of biochemical abnormalities in phenylketonuric infants. Chemical Pathology of the Nervous System, New York, Pergamon Press, 1961, pp. 38-50.

6. Berry,H.K.: Paper Chromatographic Method for Estimation of Phenylalanine. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 95, 71/73 (1957).

7. Beyerinck,M.W.: L'auxanographie, ou la méthode de l'hydrodiffusion dans la gélatine appliquée auch recherches micorbiologiques. Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles, XXIII, 367-372 (1889).

8. Bickel,H.: Aminoaciduria in childhood, Ph.D.-Thesis, Birmingham, 1952.

9. Bickel,H., Gerrard,J. and Hickmans,E.M.: The Influence of Phenylalanine Intake on the Chemistry and Behaviour of a Phenylketonuric Child. Acta paediatr. (Stockh.) 43, 64 (1954).

10. Bickel,H., and Grüter,W.: The dietary treatment of phenylketonuria. Experiences over the last nine years. In: Mental Retardation. Proc. I Internat. Med. Conf. Edit. P.W.Bowman, H.V.Mautner, Grune & Stratton (New York, London 1960).

11. Bickel,H. und Grüter,W.: Prophylaxe und Behandlung der Phenylketonurie. Dtsch. med. Wschr. 86, 39 (1961).

12. Boger,W.P., and Gavin,J.J.: Phenylketonuria. I Validation of Microbiologic Assay for Serum l-Phenylalanine. Journ. of Lab. and Clin. Med., St.Louis, 60, No.4 p.697 (1962).

13. Brandon,G.R., and Ashley,C.G.: Letters to the Editor III. J. Pediat., 62, 955 (1963).

14. Demain,A.L.: Minimal media for quantitative studies with Bacillus subtilis. J.Bact.,75, 517 (1958).

15. Fischer,R.L., Lucas,Doris G., and Jordan,R.: An improved method for determination of plasma phenylalanine by paper chromatography, Southern M.J. 53, 1600 (1960).

16. Foelling,A.: Phenylpyruvic acid as a metabolic anomaly in connection with imbecility. Nor. Med. Tideskr. 8, 1054 (1934).

17. Fölling,A.: Über die Ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure in den Harn als Stoffwechselanomalie in Verbindung mit Imbezillität. Zschr.physiol.Chem.227, 169 (1934).

18. Guthrie,R., and Tieckelmann,H.: The inhibition assay. Its use in screening urinary specimens for metabolic differences associated with mental retardation. In: Proceedings of London Conference on the Scientific Study of Mental Deficiency, London, England, pp.672 (1960).

19. Guthrie,R., and Susi,A.: A simple blood phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations. The Children's Hospital, Buffalo, New York, October 1961 (Privatveröffentlichung).

20. Guthrie,R.: PKU Screening Program Report No.3. The Children's Hospital, Buffalo, New York (August 23,1963).

21. Guthrie,R.; and Susi,A.: A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. Pediatrics,32, 338-343 (1963).

22. Guthrie,R.: Phenylketonuria detection in the newborn infant as a routine hospital procedure. A motion picture production by Designs per Medicine, Inc. State University of N.Y. Buffalo, Cildren's Hospital. 1963 (Photokopie).

23. Guthrie,R.: Briefliche Mitteilung an Prof. Bickel vom 20.Dez.1963, Seite 11.

24. Guthrie,R., and Whitney,St.: Phenylketonuria detection in the newborn infant as a routine hospital procedure. Children's bureau publication No. 419, 1964. The Children's Hospital, Buffalo, New York.

25. Guthrie,R., Krajnyak,O., Kuhn,S., Pepe,P., and Susi,A.: An "Inhibition Assay" for Detection of Maple Syrup Urine Disease in the Newborn Infant (persönliche Mitteilung an den Autor).

26. Guthrie,R., and Paigen,K.: A "Metabolite Inhibition Assay" for detection of Galaktosemia (persönliche Mitteilung an den Autor).

27. Guthrie,R., Krajnyak,O., Kuhn,S., Pepe,P., and Susi,A.: An "Inhibition Assay" for Detection of Histidinemia (persönliche Mitteilung an den Autor).

28. Guthrie,R.: Persönliche Mitteilung an den Autor (August1964).

29. Henderson,L.M., and Snell,E.E.: A uniform medium for determination of aminoacids with various microorganisms. J. Biol. Chem. 172, 15-29 (1948).

30. Henderson,L.M., Brickson,W.L., and Snell,E.E.: A micromethod for the microbiological determination of amino acids. J.Biol. Chem. 172, 31-38 (1948).

31. Hill,J.B., Summer,G.K., Pender,M.W., and Roszel,N.O.: Clin. Chem. 11, 541 (1965)

32. Howell,R.R., and LaDu,B.N.: Diagnosis of phenylketonuria: detection and interpretation of elevated serum phenylalanine levels in newborn infants. Proceedings of the Society for Pediatric Research, 32nd meeting (1962).

33. Hsia,D.Y., et al.: Serum phenylalanine and tyrosine levels in the newborn infant. New Engl. J.Med., 267, 1067 (1962).

34. Jervis,G.A.: Exretion of phenylalanine and derivatives in phenylpyruvic oligophrenia. Proc. Soc. Exper. Biol.Med. 75, 83 (1950).

35. Jervis,G.A.: Phenylpyruvic Oligophrenia (Phenylketonuria) Proc. Ass. Res. Nerv. Ment. Dis., Baltimore 33,259 (1954).

36. Jervis,G.A.: Private Mitteilung an Guthrie (Pediatrics, 32, 341, 1963.

37. Kapeller-Adler,R.: Über eine neue Reaktion zur qualitativen und quantitativen Bestimmung des Phenylalanins. Biochem.Z. 252, 185 (1932).

38. Knox,W.E.: An evaluation of the treatment of phenylketonuria with diets low in phenylalanine. Pediatrics (Springfield) 26, 1 (1960).

39. Kuhn und Desnelle: Über die Aminosäuren des gelben Ferments. Ber.Dtsch.chem.Ges. 70, 1909 (1937).

40. LaDu,B.N., and Michael,P.J.: An Enzymatic Spectrophtometric Method for the Determination of Phenylalanine in Blood. Journ. of Lab. and Clin. Med., 55, 491-495 (1960).

41. LaDu,B.N., Howell,R.R., Michael,P.J., Sober,E.K.: A quantitative micromethod for the determination of phenylalanine and tyrosine in blood and its application in the diagnosis of phenylketonuria in infants. Pediatrics, Vol.31, No.1, Part I (January,1963).

42. Linneweh,F. und Ehrlich,M.: Die renalen und prärenalen Störungen des Aminosäuren-Stoffwechsels bei phenylalaninarmer Ernährung. Klin.Wochenschr. 38.Jahrg. 18.Heft, Sept.1960, S.909.

43. Mabry,C.C., Nelson,T.L., Horner,F.A.: Clin.Pediat.1, 82 (1962).

44. McCaman,M.W., and Robins,E.: Fluorimetric method for the determination of phenylalanine in serum. J.Lab.Clin.Med. 59, 885 (1962).

45. McCready,R.A.: Letters to the Editor I. J.Pediat. 62, 954 (1963).

46. Meister,A.: Biochemistry of the Amino Acids. Academic press inc. New York, 122/123 (1957).

47. Mitoma,Ch., Auld,R.M., and Udenfriend,S.: On the nature of enzymatic defect in phenylpyruvic oligophrenia. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 94, 634 (1957).

48. Moore,S., and Stein,W.H.: Chromatography of Amino Acids on Sulfonated Polystyrene Resins. J.Biol.Chem. 192, 662-681 (1951).

49. Moore,S., and Stein,W.H.: Procedures for the Chromatographic Determination of Amino Acids on Four Percent Cross-Linked Sulfonated Polystyrene Resins. J.Biol.Chem. 211, 893-906 (1954).

50. Moore,S., and Stein,W.H.: A modified Ninhydrin Reagent for the Photometric Determination of Amino Acids and Related Compounds. J.Biol.Chem. 211, 907-913 (1954).

51. Moore,S., Spackman,D.H., and Stein,W.H.: Chromatography of Amino Acids on Sulfonated Polystyrene Resins. Analyt. Chem. 30, 1185-1190 (1958).

52. Partington,M.W.: The early Symptoms of Phenylketonuria. Pediatrics 27, 465 (1961).

53. Partington,M.W., and Sinnott,B.: Case finding in Phenylketonuria: The Guthrie Test. Canad. Med. Ass. J. July 1964, Vol.91, p. 105-114.

54. Scheel,C., and Berry,H.K.: Comparison of Serum Phenylalanine levels with Growth in Guthrie's inhibition assay in Newborn infants. Journal of Pediatrics, St.Louis, Vol.61, No.4, p. 610-616 (1962).

55. Udenfriend,S., and Cooper, J.R.: Assay of L-Phenylalanine as Phenylethylamine after Enzymatic Decarboxylation; Application to Isotope Studies. J.Biol. Chem. 203, 953 (1953).

56. Udenfriend,S., and Bessman,S.P.: The hydroxylation of Phenylalanine and antipyrine in Phenylpyruvic oligophrenia. J. Biol. Chem. 203, 961 (1953).

57. Wallace,H.W., Moldave,K., and Meister,A.: Studies on conversion of phenylalanine to tyrosine in phenylpyruvic oligophrenia. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 94, 632 (1957).

58. Woolf,L.J.: Exretion of conjugated phenylacetic acid in phenylketonuria. Biochem. J. 49, IX (1951).

59. Woolf,L.J. et al.: Atypical Phenylketonuria in Sisters with normal Offspring. Lancet, 2, 464 (1961).

60. Woolf,L.I., and Goodwin,B.L.: Determination of Phenylalanine in Blood and Urine. Clinical Chemistry, Vol.10, No. 2, (Febr.1964).

61) Zeller,E.A.: Isolierung von Phenylmilchsäure und Phenylbrenztraubensäure aus Harn bei Imbecillitas phenylpyruvica. Helvet. chim. acta 26, 1614 (1943).

L e b e n s l a u f

Am 10. Februar 1939 wurde ich als erstes der drei Kinder des Pfarrers Dr. Erich v. Eicken und seiner Ehefrau, der Studienassessorin Elfriede v. Eicken, geb. Schleining, in Marburg geboren.

Von Herbst 1945 bis Frühjahr 1950 besuchte ich in Marburg die Volksschule.

Ostern 1950 bestand ich die Aufnahmeprüfung für das Gymnasium Philippinum in Marburg und legte am 3. März 1959 an der gleichen Schule die Reifeprüfung ab.

Am 24. April 1959 wurde ich an der Medizinischen Fakultät der Philipps Universität Marburg immatrikuliert. Nach 3semestrigem Studium bestand ich in Marburg am 2. August 1960 die naturwissenschaftliche ärztliche Vorprüfung. Nach weiteren 3 Semestern legte ich am 6. März 1962 in Marburg auch die ärztliche Vorprüfung ab. Im Sommersemester 1962 setzte ich mein Studium in Hamburg fort. Ab Wintersemester 1962/63 studierte ich wieder in Marburg und bestand dort am 25. März 1966 das medizinische Staatsexamen.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten

in H a m b u r g

Bartelheimer, Bochnik, Bürger-Prinz, Dietel, Dörken, Habs, Harders, Harmsen, Höhne, Hornbostel, Krauspe, Luckner, Maas, Malorny, Mittelstraß, Sauer, Schmitt-Rohde, Stelzner, Zukschwerdt

in M a r b u r g

Beckmann, Behrend, Berendes, Bickel, Braun-Falco, Brück, Bücher, Cleve, Deicher, Dimroth, Dittrich, Dölle, Exner, Gedigk, Golenhofen, Hamm, Hartmann, Hardewig, Hensel, Heuser, Hildebrandt, Hornung, Huber, Jacob, Kessler, Knauff, Kottmeyer, Krönke, Lang, Linneweh, Lübbers, Mahr, Mann, Martini, Marx, Mattes, Maurath, Mesnil de Rochemont du, Neubauer, Niessing, Oehme, Oksche, Petry, Poetschke, Rodeck, Rodenhäuser, Rohen, Salfeld, Sauer, Schiff, Schleyer, Schölmerich, Schmid, Schmitz, Schrappe, Schultze, Schwaiger, Seidel, Siegert, Siess, Spiegelberg, Stender, Straub, Streicher, Vogt, Walcher, Wendt, Würterle

Herrn Prof. Dr. med. F. Linneweh gilt mein Dank dafür, daß ich an seiner Klinik lernen und arbeiten durfte. Herrn Prof. Dr. med. H. Bickel möchte ich besonders herzlich danken für alle Anregungen, kritischen Diskussionen und für seine immer bereite Hilfe bei der Durchführung der Experimente. Herrn Prof. Dr. R. Guthrie und seiner technischen Assistentin, Miß Olga Krajnyak, danke ich für die Hilfe bei der Einarbeitung des Testes; gleichfalls Herrn Dr. Mannheim vom bakteriologischen Institut der Universität Marburg für zahlreiche Hilfeleistungen und Ratschläge, die für diese Arbeit von grundsätzlicher Bedeutung waren.